

平成23年度戦略的技術開発委託費
医療機器等の開発・実用化促進のためのガイドライン策定事業
(医療機器に関する技術ガイドライン作成のための支援事業)

テーラーメイド医療用診断機器分野（DNAチップ）
開発WG報告書

平成24年3月

独立行政法人 産業技術総合研究所

平成 23 年度テラーメイド医療用診断機器（DNA チップ）開発ワーキンググループ委員名簿

（敬称略、五十音順、※座長）

氏名

所属

秋山 英雄	東レ株式会社 新事業開発部門 主席
油谷 浩幸	東京大学 先端科学技術研究センター 教授
楠岡 英雄	国立病院機構 大阪医療センター 院長
久原 哲	九州大学大学院 農学研究院 教授
桑 克彦	日本臨床検査標準協議会（JCCLS） 理事
住谷 知明	プレシジョン・システム・サイエンス株式会社 事業開発担当 部長
橋本 幸二	株式会社東芝 部品材料事業統括部 DNA事業推進統括部 DNAチップ技術・開発担当 グループ長
※林 慎一	東北大学大学院 医学系研究科 教授

開発 WG 事務局

木山 亮一

（独）産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門 主任研究員

テーラーメイド医療用診断機器（DNA チップ）開発 WG 委員会 開催日

第 1 回開発 WG 委員会

開催日時 平成 23 年 11 月 16 日（水）

第 2 回開発 WG 委員会

開催日時 平成 24 年 1 月 12 日（木）

第 3 回開発 WG 委員会

開催日時 平成 24 年 2 月 23 日（木）

目 次

1. 「テーラーメイド医療用診断機器分野」の概要	1
2. 「テーラーメイド医療用診断機器分野」におけるガイドライン策定の意義	2
2.1 背景と経緯	2
2.2 本ガイドライン事業について	2
2.3 遺伝子診断に関わるガイドラインの現状について	4
3. ガイドラインの検討過程	6
3.1 ガイドラインの検討過程	6
3.1.1 第1回開発 WG 委員会	6
3.1.2 第2回開発 WG 委員会	10
3.1.3 第3回開発 WG 委員会	13
3.2 話題提供	17
3.2.1 話題提供(1)	17
3.2.2 話題提供(2)	18
3.2.3 話題提供(3)	19
3.3 委託調査	21
3.4 欧米における DNA チップ関係の規制及び報告書	23
3.4.1 米国 FDA によるガイダンスの例 1（翻訳文）	23
3.4.2 米国 FDA によるガイダンスの例 2（翻訳文）	38
3.4.3 欧州 SPIDIA 中間報告書（翻訳文）	63
3.5 DNA チップに関する実証試験	73
3.5.1 実験目的	73
3.5.2 実験方法	73
3.5.3 実験結果及び考察	75
3.5.4 参考文献	76
4. ガイドラインの検討結果	77
遺伝子発現解析用 DNA チップ [改訂版] 開発ガイドライン 2011（案）	
5. 英語版ガイドライン	86
6. 平成 23 年度の総括と今後の展望	87

参考資料

1. 本年度ガイドライン事業の説明資料
2. 本年度 DNA チップ開発ガイドライン事業の説明資料
3. 委託調査報告
 - 3.1 「遺伝子発現解析用 DNA チップ開発状況調査最終報告」
特定非営利活動法人バイオチップコンソーシアム事務局長 中江裕樹氏
 - 3.2 「平成 23 年度委託研究遺伝子発現解析用 DNA チップ開発状況調査」最終報告書
特定非営利活動法人バイオチップコンソーシアム

1. 「テーラーメイド医療用診断機器分野」の概要

本「医療機器等の開発・実用化促進のためのガイドライン策定事業」は、経済産業省の委託事業として独立行政法人産業技術総合研究所が実施したものである。企業に対しては円滑な開発を進めるような情報を発信し、審査機関に対しては迅速な審査を進めるような情報を発信するため、経済産業省と厚生労働省が連携してガイドライン策定事業を進めている。それぞれの省から委託を受けた研究所（経済産業省は産業技術総合研究所、厚生労働省は国立医薬品食品衛生研究所）は、それぞれ開発ガイドライン案、評価指標案という形で提言を出し、経済産業省から開発ガイドライン、厚生労働省から通知という形で公表される。

本「テーラーメイド医療用診断機器分野」は、診断用 DNA チップを主体にしたテーラーメイド医療用診断機器を対象に開発ガイドラインを策定する事業である。本分野は、第 4 回次世代医療機器開発ガイドライン検討委員会（経済産業省）と次世代医療機器評価指標検討会（厚生労働省）の合同による検討会（合同検討会）において新たな検討分野として追加され、平成 18 年度より事業を開始した。診断用 DNA チップに関するガイドライン（DNA チップ開発ガイドライン 2007）は最初に公表されたガイドラインのひとつで、平成 19 年 5 月に公表された。これまでに、平成 18～19 年度、平成 21～22 年度に事業を行い、平成 23 年度は平成 22 年度の継続として事業を進めた。昨年度の本事業では遺伝子発現解析用 DNA チップに関するガイドライン案をまとめた。全体の概要は、2007 年版のガイドラインを参考に、測定装置、評価法、標準物質に分けて検討し、遺伝子発現解析版に修正した。

本年度は、MAQC-II の報告を基にした予測モデルに関する検討項目と SPIDIA の中間報告を基にしたプリアナリシスに関する項目を中心に、昨年度の改訂版の作成を行った。また、遺伝子診断用 DNA チップに関する最新情報を得るために、国内外の開発動向に関する話題提供を受け、さらに、詳細な情報を得るために、企業ヒアリングによりその必要性や各国のガイドラインや国際標準などについて調査を委託し、最新情報を得た。また、本年度ガイドライン策定に必要な情報として、FDA 資料や SPIDIA ニュースレターの翻訳資料を作成し、DNA チップに関するアプリケーションと信頼性の評価例をいくつかの化学物質について試験を行った。

これらの情報をもとに、開発ワーキンググループ委員会で、「概要」、「測定装置」、「評価法」、「標準物質」に分けてガイドラインの検討を行い、検討結果を「遺伝子発現解析用 DNA チップ〔改訂版〕開発ガイドライン 2011（案）」としてまとめた。

今後は、JIS や ISO などの基準の検討など、ガイドラインの普及活動を行うことでガイドラインの有用性の理解を広める活動が重要になる。また、テーラーメイド医療機器としては DNA チップ以外の遺伝子診断装置が存在していることから、本事業の成果が遺伝子診断装置やその検体調製装置など、多くの関連する医療機器にも活用されることを期待したい。また、本ガイドラインが、工業会・企業における効率的な機器開発に貢献し、審査機関においては迅速な承認審査に寄与し、学会においても研究開発などに有用な情報源となることを真に期待したい。

2. 「テーラーメイド医療用診断機器分野」におけるガイドライン策定の意義

2.1 背景と経緯

本事業の正式名称は「医療機器等の開発・実用化促進のためのガイドライン策定事業」で、経済産業省の委託事業として独立行政法人産業技術総合研究所が実施したものである（参考資料 3 参照）。本事業は平成 17 年度から本年度まで継続して行われている。事業の対象となる医療機器として、手術ロボット、人工心臓、人工関節、再生医療、DNA チップなどの分野がある。診断用の医療機器の開発から臨床導入までの時系列で、企業に対しては円滑な開発を進めるような情報を発信し、審査機関に対しては迅速な審査を進めるような情報を発信するため、経済産業省と厚生労働省が連携して本事業を進めている。

本開発ガイドライン策定事業の目的は以下のように要約できる。

- (1) 迅速な審査を可能とする審査ガイドライン（ガイダンスなども含む）に対して、技術情報、評価方法、評価物質などを提供する。
- (2) 円滑な開発や承認申請を可能とする手引き（手引き書、解説書）を提示し、必要に応じて JIS 提案、基準物質や試験方法を提案して手引き書に加味する。
- (3) 企業における開発の指針になるような開発ガイドラインを策定する。

それぞれの省から委託を受けた研究所（経済産業省は産業技術総合研究所、厚生労働省は国立医薬品食品衛生研究所）は、それぞれ開発ガイドライン案、評価指標案という形で提言を出し、経済産業省から開発ガイドライン、厚生労働省から通知という形で公表される。本分野は、第 4 回次世代医療機器開発ガイドライン検討委員会（経済産業省）と次世代医療機器評価指標検討会（厚生労働省）の合同による検討会（合同検討会）において新たな検討分野として追加され、平成 18 年度より事業を開始した。診断用 DNA チップに関するガイドライン（DNA チップ開発ガイドライン 2007）は最初に公表されたガイドラインのひとつで、平成 19 年 5 月に公表された。厚生労働省からは、平成 20 年に診断用 DNA チップに関する評価指標として医療機器審査管理室長通知が通達された。

2.2 本ガイドライン事業について

本分野における開発ガイドライン策定事業は、診断用 DNA チップを主体にしたテーラーメイド医療用診断機器を対象に開発ガイドラインを策定する事業である。これまでに、平成 18～19 年度、平成 21～22 年度に事業を行い、平成 23 年度は平成 22 年度の継続として事業を進めた。

遺伝子診断用 DNA チップとしては、薬剤代謝能に関係する多型を判定することで患者に投与する薬剤の代謝速度を診断する「遺伝子多型検定用 DNA チップ」と、例えばがん細胞における遺伝子発現を解析することで原発がんや悪性度・進行度の判定や薬剤抵抗性の判定などをもとに診断を行う「遺伝子発現解析用 DNA チップ」に大きく分けることが出来る（図「遺伝子診断用 DNA チップ」参照）。前者は、2004 年（平成 16 年）にロッシュモレキュラーダイアグノスティックス（ロッシュ）社が薬剤代謝能判定用 DNA チップ（商品名：AmpliChip CYP450）があり、診断用 DNA チップとして初めて米国 FDA（アメリカ食品医薬品局）の承認を得た。一方、後者は、Agendia 社の乳癌転移リスク評価のための DNA チップ（商品名：MammaPrint）があり、2007 年（平成 19 年）2 月に米国 FDA により IVDMIA（In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assay：体外診断用複数指標測定法）として承認された。

このような背景のもと、平成 18 年度には、各学会、企業、大学・公的研究機関を代表して合計 7 名の委員により検討を行い、開発ガイドライン案を策定し、合同検討会と経済産業省の承認を経て、平成 19 年 5 月に「DNA チップ開発ガイドライン 2007-遺伝子型（ジェノタイピング）検定用 DNA チップに関して-」の公表に至った。

遺伝子診断用 DNA チップ

遺伝子型判定用 DNA チップ

- ・遺伝子型判定を行う DNA チップ
- ・薬剤耐性遺伝子の多型判定（ 2009 年薬事承認）
- ・ウイルスの遺伝子型判定（ 2009 年薬事承認）
- ・多くの場合、一度判定すると再検は不必要
- ・がんの遺伝子型判定にも利用可（開発段階）

遺伝子発現解析用 DNA チップ

- ・遺伝子の発現解析を行う DNA チップ
- ・乳がんの転移リスク判定など（ FDA 承認）
- ・経過判定など何度も使用する
- ・IVDMIA（体外診断多変指標測定）として有効
- ・がんの遺伝子発現解析に特に有効

特徴

技術・製品例

東芝：蛍光色素を用いない電流検出型 DNA チップ



DNAチップカセット

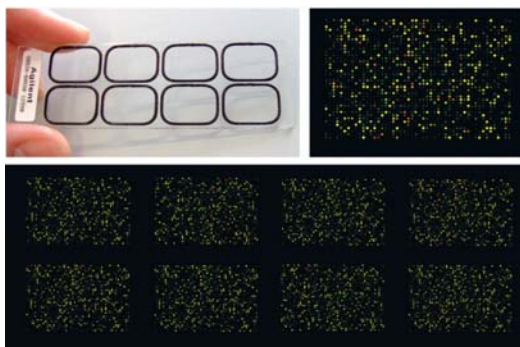


医療用DNA検査装置

「ヒトパピローマウイルス型判別用DNAチップ」の薬事申請について（ 2007 年 6 月 15 日、東芝ホームページより）
 （内容）第一化学薬品株式会社、株式会社東芝、東芝ホクト電子株式会社は、共同で開発を進めてきたヒトパピローマウイルスを型判別するDNAチップの体外診断用医薬品の製造販売承認申請を行った。

MammaPrint（蘭国 Agendia 社）

・細胞周期、浸潤、転移、血管新生などに関わる遺伝子 70 個を同時に測定し、特別のアルゴリズムを用いて、遠隔転移リスクをスコアで示す。



平成 19 年度は、開発ガイドライン普及活動として、内容に対する企業の理解を深め、また開発への利用を促すために、標準化の活動を進めた。具体的には、大学、国立研究機関、企業並びに経済産業省関連部署及び標準関連団体から診断用 DNA チップの開発、研究、知財、規格、あるいは、行政にかかわる専門家が参加する委員会を開いて標準仕様書（TS）原案の検討と作成を行った。

その間、我が国においても国内外の企業から遺伝子型検定用 DNA チップの薬事承認申請及び厚生労働省による承認が続いたことから、ガイドラインの策定は現実的に薬事申請と歩調を合わせて進んだ。

さらに、もう一つのタイプの遺伝子発現解析用 DNA チップに関しても薬事申請の動きがあり、また、それ以外の IVDMIA の薬事申請も今後進められると考えられることから、平成 21 年度に、新たに遺伝子発現解析用 DNA チップに関するガイドライン策定事業を開始した。平成 22 年度は、平成 21 年度から継続してガイドライン策定事業を行ない、「遺伝子発現解析用 DNA チップ開発ガイドライン 2010」を策定した。その間、次項で示すような新しい動きがいくつか見ら

れたため、平成 23 年度も事業を継続し、修正が必要な項目に関して議論を行い、「遺伝子発現解析用 DNA チップ [改訂版] 開発ガイドライン 2011 (案)」を策定した (参考資料 4 参照)。

2.3 遺伝子診断に関わるガイドラインの現状について

遺伝子診断に関わるガイドラインなどの規制や標準化などの動向は、ここ数年新たな展開を見せている (図「ガイドラインに関連する活動」参照：詳細は「3.3 委託調査」参照)。もともと DNA チップに関するガイドラインは、ゲノム情報の申請データが増えたのでそのデータの中でも重要であるが複雑な DNA チップに関するデータのサブミッションの形式や基準などが必要になったという理由が背景にある。薬事申請が国外で進み、我が国でも申請の動きが出てきたため、国内でも DNA チップに関するガイドラインが必要になった。本 DNA チップガイドライン事業は、平成 18～19 年度、21 年度から本年度にかけて事業を行っており、平成 19 年に遺伝子型検定用 DNA チップに関するガイドラインを公表した。また、平成 19 年度には標準仕様書 (TS) の原案を取りまとめた。一方で、本事業の間に実際の薬事申請などが行われた。

ガイドラインに関連する活動

・地域	・ガイドライン	・時期	・内容等
・欧州	・SPIDIA プロジェクト	・2008～	・前処理過程の標準化
・米国	・MAQC I and II	・2005～	・マイクロアレイ測定 of 標準化
	・RT-PCR 用前処理ガイドライン	2005	Class II Special Controls Guidance Document; RNA Preanalytical Systems (RNA Collection, Stabilization and Purification Systems for RT-PCR used in Molecular Diagnostic Testing)
	・IVDMIA ガイドライン	・2007	・Draft Guidance for Industry, Clinical Laboratories, and FDA In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assays (IVDMIA)
	・乳がん予後予測ガイドライン	・2007	・Class II Special Controls Guidance Document; Gene Expression Profiling Test System for Breast Cancer Prognosis 2007
	・PGx データ提出ガイドライン	・2007	
	・遺伝形質の分子遺伝学的検査のための GLP	・2009	・Good Laboratory Practices for Molecular Genetic Testing for Heritable Disease and Conditions
・日本	・遺伝子型検定用 DNA チップ (経済産業省)	・2007	・テラーメイド医療用診断機器 (DNA チップ) 開発ガイドライン ・遺伝子型 (ジェノタイプ) 検定用 DNA チップに関して
	・遺伝子型判定用 DNA チップ (厚生労働省)	・2008	・次世代医療機器評価指標の公表について ・DNA チップを用いた遺伝子型判定用診断薬に関する評価指標
・OECD	・分子遺伝学的検査における質保証に関する OECD ガイドライン	・2007	・OECD GUIDELINES FOR QUALITY ASSURANCE IN MOLECULAR GENETIC TESTING
・ISO	・GMO 検出	・-	・Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products
	・マイクロアレイ解析	・2010～	・NWIP – CD : General definitions and requirements for microarray detection of specific nucleic acid sequences

バイオチップコンソーシアム委託調査 2011 より

すでに前項で説明したが、遺伝子診断用の DNA チップは大きく分けて 2 種類あり、遺伝子型判定用 DNA チップと遺伝子発現解析用 DNA チップに分けられる。遺伝子型判定用 DNA チップは、日本でも既に薬事承認例が出ている。一方、遺伝子発現解析用 DNA チップは、米国では MammaPrint をはじめ数例の FDA 承認例が出ているが、我が国ではまだ申請されていない。これからその申請があるという可能性が高いため、遺伝子発現解析用 DNA チップの開発と薬事申

請に役立つ資料の作成を目標として本事業を進めている。そのために必要な情報として、上記の参考資料について紹介する。

【MAQC-II 報告】 MAQC-I では個々の最初の DNA チップの信頼性を確保することを目標とした。MAQC-II ではさらに先の Classifier（分類予測）について検討を行い、結果をまとめている。具体的な検討内容は、検体に関する情報の取扱い、データの標準化、標準化データの作成法、アルゴリズムや検定法について検討している。6 組のデータセットを使って検討し、評価項目は 13 種類、6 組のプラットフォームを使い、Affymetrix 社だけではなく Amersham や Agilent の DNA チップも使っている。トレーニングセットで検討して、バリデーションのセットで検定し、それに関与するファクターと統計法などを検討している。

【SPIDIA の中間報告】 SPIDIA はプリアナリシスの標準化を目指すプロジェクトで、2008 年から 2012 年の 4 年間で、1,300 万ユーロを使って 7 つの公的研究機関、8 つの企業・標準化機関がコンソーシアムをつくって標準化を進めている。体外診断薬に利用するプリアナリシスの標準化と改善が目標である。SPIDIA が始まった理由は、体外診断薬の開発が進んで標準化が必要になってきたことにあり、特に検体の輸送や保管の影響を受けて変化する RNA を扱う場合には、それなりの標準化が必要になったためである。具体的な例として、免疫組織解析法の標準化のためのシステム「PAXgene Tissue System」を作成し、そのデータを収集した。また、血液検体を中心にしてプリアナリシスの標準化を進めるため、30 カ国の 219 の研究室から 322 のアプリケーションを集めてプロトコルを検証した。リングトライアル（輪番検証）で、様々な研究機関と連携して検証を行った。対象は PAXgene Blood RNA チューブを用いて取得した検体で、QIAGEN 社が出している製品を使ってその品質管理を多くの研究機関で進めて、SPIDIA のラボで精製したものの検定を行って品質を評価し、その評価を 2 カ所で行うことで信頼性を検証した。つまり、プリアナリシスの標準化はヨーロッパの企業の製品を使って標準化を進めるということである。さらに、標準化のための自動化システムの作成を進めるため、QIASymphony SP 自動化検体調製プラットフォーム（QIAGEN 社）を基に全 RNA を血液検体から精製する完全自動化プロトコルを開発している。PAXgene Blood RNA System は採血管で、PreAnalytix 社の製品であり、PreAnalytix 社は BD と QIAGEN のジョイントベンチャーである。採血管は日本 BD から、核酸精製キットは QIAGEN から出ており、いずれもヨーロッパの企業である QIAGEN 社を中心に標準化が進められている。

昨年度、開発ガイドライン事業では 3 回の委員会を開催してガイドライン案をまとめた。全体の概要は、2007 年版のガイドラインを参考に、測定装置、評価法、標準物質に分けて検討し、遺伝子発現解析版に修正した。本年度は、MAQC-II の報告を基にした予測モデルに関する検討項目と SPIDIA の中間報告を基にしたプリアナリシスに関する項目を中心に、昨年度の改訂版の作成を行った。また、ガイドラインの英文訳と委託調査を行った。調査内容は、技術内容に関するヒアリングと MAQC と SPIDIA に関するは動向調査、それから、遺伝子診断の基盤になる研究の調査である。

3. ガイドラインの検討過程

3.1 ガイドラインの検討過程

3.1.1 第1回開発WG委員会

(1) 開催日時：平成23年11月16日（水） 15:00～17:00

(2) 開催場所：オフィス東京 2階 L会議室

(3) 出席者

委員：林 慎一、秋山 英雄、油谷 浩幸、久原 哲、桑 克彦、橋本 幸二、住谷 知明

経済産業省：村上一徳

国立医薬品食品衛生研究所：鈴木 孝昌、宮島 敦子

医薬品医療機器総合機構：水上 良明

バイオチップコンソーシアム：山本 伸子、池田 純子

産業技術総合研究所：大塚 幸雄

事務局：木山 亮一（産業技術総合研究所）

(4) 配布資料

資料1：医療機器等の開発・実用化促進のためのガイドライン策定事業（経済産業省）

資料2：話題提供資料

「遺伝子発現解析用DNAチップ開発動向について」

特定非営利活動法人バイオチップコンソーシアム研究部 主任研究員 山本 伸子氏

資料3：本年度DNAチップ開発ガイドライン事業の説明

資料4：本年度審査ガイドライン事業の説明

4-1：審査WG（第1回）議事概要(案)

4-2：審査WG（第2回）議事概要(案)

4-3：「FDA承認事例における臨床性能評価に関して」

（国立医薬品食品衛生研究所 鈴木孝昌）

資料5：テラーメイド医療用診断機器（DNAチップ）開発ガイドライン2011-遺伝子発現解析用DNAチップに関して-（平成22年度開発ガイドラインWG委員会最終案）

資料6：DNAチップ開発ガイドライン検討資料

6-1：「クラスII特別規制ガイダンス文書：乳癌の予後のための遺伝子発現プロファイリング試験システム：2007年5月9日」

6-2：“Class II Special Controls: Gene Expression Profiling Test System for Breast Cancer Prognosis” (May 9, 2007)（原本）

6-3：「in vitro 診断用複数指標測定法：ガイダンス草案：2007年7月26日」

6-4：“In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assays”(July 26, 2007)

6-5：「クラスII特別管理ガイダンス文書：RNAプレアナリティカルシステム（分子診断検査に使用するRT-PCR用RNA採取・安定化・精製システム）：2005年8月25日」

6-6：“Class II Special Controls Guidance Document: RNA Preanalytical Systems (RNA Collection, Stabilization and Purification Systems for RT-PCR used in Molecular Diagnostic Testing)” (August 25, 2005)

6-7 : “DRAFT GUIDANCE: Pharmacogenomic Data Submissions” (August 24, 2007)

6-8 : “SPIDIA Newsletter 10/2011” (October, 2011)

6-9 : “The MicroArray Quality Control (MAQC)-II study of common practices for the development and validation of microarray-based predictive models.” Nat Biotechnol. 2010 Aug;28(8):827-38.

(5) 議事概要（討議内容の説明：資料 3）

○ DNA チップの開発ガイドライン事業に関しては、ゲノム情報の申請データが増えたのでそのデータのサブミッションの形式や基準などが必要になったという理由が背景。薬事申請が国外で進み、国内でも必要になった。本 DNA チップガイドライン事業は、平成 18 年度、19 年度、21 年度から本年度にかけて事業を行っており、平成 19 年に遺伝子型検定用 DNA チップに関するガイドラインを公表。平成 19 年度には標準仕様書（TS）の原案という形で取りまとめた。事業の間に実際の薬事申請などが行われた。

・ 遺伝子診断用の DNA チップは大きく分けて 2 種類あり、遺伝子型判定用 DNA チップと遺伝子発現解析用 DNA チップ。遺伝子型判定用 DNA チップは、日本でも既に薬事承認例が出ている。一方、遺伝子発現解析用 DNA チップは我が国ではまだ申請がされていない。これからその申請があるという可能性が高いのでガイドラインを策定する。例は MammaPrint。

・ MAQC-II の報告内容。MAQC-I では個々の最初の DNA チップの信頼性を確保することを検討。MAQC-II ではさらに先の Classifier。具体的には検体に関する情報とか、データの標準化、標準化データの作成法とか、その対象の決定とか、アルゴリズムの修正とか、検定法を検討。6 組データセットを使って検討。評価項目は 13 種類。6 組のプラットフォーム。Affymetrix 社だけではなく、Amersham とか Agilent のマイクロアレイを使っている。トレーニングセットで検討して、バリデーションのセットで検定。考慮するファクターと統計法などを検討。

・ SPIDIA の中間報告。SPIDIA はプリアナリシスの標準化を目指すプロジェクト。2008 年から 2012 年の 4 年間で、1,300 万ユーロを使って 7 つの公的研究機関、8 つの企業、標準化機関がコンソーシアムをつくって標準化を進める。体外診断薬に利用するプリアナリシスの標準化と改善を目標。SPIDIA が始まった理由は、体外診断薬の開発が進んで標準化が必要になってきた。特に検体の輸送や保管の影響を受けて変化する RNA を扱う場合にはそれなりの標準化が必要。具体的な例として免疫組織解析法の標準化のためのシステム「PAXgene Tissue System」。血液検体を中心にしてプリアナリシスの標準化を進めるため、30 カ国の 219 の研究室から 322 のアプリケーションを集めてプロトコルを検証。リングトライアル（輪番検証）で、連携して検証を行う。対象は PAXgene Blood RNA チューブということで、QIAGEN 社が出している製品を使ってその品質管理をたくさんの所で進めて、SPIDIA のラボで精製したものの検定を行って品質を評価。それを 2 カ所で行うことで信頼性を検証する。つまり、プリアナリシスの標準化はヨーロッパの企業の製品を使って標準化を進めるということ。

・ 標準化のための自動化システム。QIASymphony SP 自動化検体調製プラットフォーム（QIAGEN 社）を基に全 RNA を血液検体から精製する完全自動化プロトコルを開発中。

PAXgene Blood RNA System は採血管で、PreAnalytix 社の製品。PreAnalytix 社は BD と QIAGEN のジョイントベンチャー。採血管は日本 BD から、核酸精製キットは QIAGEN から出ている。

- ・昨年度、開発ガイドライン事業では3回の委員会を開催してガイドライン案をまとめた。项目的には、全体の概要、測定装置、評価法、標準物質で、2007年版のガイドラインとほぼ同じような項目だが、遺伝子発現用に修正した。本年度は、プリアナリシスのところを検討したい。

- ・委託調査をバイオチップコンソーシアムにお願いする。調査内容は3点考えている。ヒアリングは、広く技術内容について調査を考えている。MAQCとSPIDIAについては動向調査。遺伝子診断の基盤になるような研究の調査。

- ・「本年度の検討内容案」。昨年度、一応案として非常にいいものが出来た。それを最新の情報を基に修正をするか、あるいは項目を追加する。1つは、MAQC-IIの報告を基にした予測モデルに関するポイント。さらに、SPIDIAの中間報告を基にしたプリアナリシスに関する項目。それから、審査WGのほうの臨床性能評価の議論を開発WGのほうでも活かせるポイントがあるかないかを検討していただきたい。それから、ガイドラインの英文訳も検討したい。

(審査WGの説明)

○昨年度末に報告書で、基本性能の部分に関してはかなりファイナライズした形になった。臨床性能評価が、非常に難しい課題で今年度も引き続き討論している。既に2回審査WG会議で議論を深めた。第1回の会議のときに「FDA承認事例における臨床性能評価に関して」を説明。

- ・MammaPrint、Pathwork Tissue of Origin、AlloMapを説明。

- ・承認をされているのは3つしかない。オンコタイプDXはMammaPrintよりも米国では使われていて普及しているが、FDA承認を取っていない。アメリカでは承認を取らなくても保険が付くので承認を取る必要はない。CLIAのLDTとして認めて、使われていれば、保険会社が保険を付けさえすれば承認を取る必要がない。日本では承認を取らないと保険は付かない。

- ・臨床性能のところで重要な点。まず対象患者を正しく選択すること。アルゴリズム作成に未使用な患者のサンプルを使って、最終的には臨床のバリデーションをしなければいけない。少なくとも3機関から集めたサンプルを使ってデータを取りなさいということ。参考論文等があれば参考情報になる。前向きに収集されてバンク化されたサンプルを使った、後ろ向き試験も受け入れる。

- ・どれだけのサンプル数が必要かという議論。一般的な数字を出すかどうか。FDAは、評価のための統計手法をきちんと決めて、その統計的に有意差を言うために必要な数によって患者数は決まる。統計的に有意差を言えるだけの患者数は、かなり大きな数が必要になってくるのではない。

- ・評価指標。実際にそれで申請承認を取れるものが出てくるのが目的。より承認申請を取りやすくするような、ほかの新しい仕組みや、条件は緩めにして後から追加で市販後のデータを取って、それをもって再評価するようなシステムみたいなものはできないかなどという議論がある。

(ガイドライン検討項目の説明と討議：資料5及び6)

○第1回はガイドライン項目の検討する項目に関してどういう検討を行うかということを決めていただき、次回に委員の方々が検討した中間の検討内容を発表、事務局でまとめた案を第3回で検討するのがひとつの案。

○ 検討内容が示されている。MAQC-II の報告を基にした予測モデルと統計法に関する部分と、SPIDIA を中心とした前処理の部分に対するガイドラインの補強。必ずしもこれに縛られるものではない。

○ 昨年度は MAQC-II の情報を用いてデータ解析とか判定アルゴリズムに関して書いた。これ以上細かく書くと、このガイドラインが縛りになってしまう。このガイドラインというのは各企業がある意味で少し広くとっておくことによって、承認に持っていく産業にプッシュする材料としてこれを活用したいという企業の思いがある。これに関しては大幅に変える必要はないと考えている。実際のサンプルの検体の処理、保存、試薬について、ガイドラインとなるように書いてある。SPIDIA の中間報告は、一般的な実験の押さえるべき所としてはこのぐらいかと考えている。例えば機械を作る場合の前処理のところで、あとはここに追加すべき項目があれば、それを追加するのが良いのではないか。

○ SPIDIA の報告書ではかなり詳細な項目が出てきている。ガイドラインを努力目標として出して、並行して標準化を日本でも進めていけばいいが、その標準化がうまくいっていない。このガイドライン事業で標準化のほうも少しカバーしたほうがいい。標準化の内容については MAQC-II と SPIDIA は詳細な情報が出てきているので、こういう情報がありますよという情報を伝えることもいいのかもしれない。

○ MAQC-II 自体は、DNA チップの標準化を推進しているというわけではない。どんなアルゴリズムを使おうがいちばん重要なのは経験の差。それは標準化とは違う次元の話。MAQC 自体が DNA チップの標準化を推進しているかということ、そうではない。むしろ DNA チップのデータの標準化ということでは、MIAME を作った MG、いまでは FGD という組織が、データの標準化をやっている。ガイドラインの中に標準化の項目を入れるのは、逆に次元の違う話が入ってしまっている。ガイドラインというのはあくまでもこれに即した形で各企業が開発していく。標準化というのは押さえるべき所はどこかと。今回のガイドラインは、DNA チップそのものに ISO のドキュメントがない以上、このガイドラインで標準化というのはちょっと観点が違うのではないか。

○ 開発の WG のほうではメーカーが測定システムとして設定するときの性能評価の方法や基本性能についてのガイドラインを作って、その装置を用いて臨床試験をやり、その臨床試験をやった結果が審査に回る。ですから、審査として臨床の要求に応えられるようなものであれば、何も標準化されていなくてもいいのではないか。標準化するにはある程度出てきたものがお互いに不一致になるとか、臨床のメリットに齟齬が出ることになったら、その時点で標準化を考えればよい。

○ 標準化は次回に議論したい。検討内容案として出てきているモデルに関すること、統計法に関すること、前処理に関すること等があるので、検討しておいていただきたい。それぞれの項目の担当者は少なくとも見ておいていただくことが効率的。予測モデル統計法に関することと、前処理に関すること、メインに考えておいていただく方は、前処理に関することは住谷先生、私（林座長）、油谷先生、楠岡先生、モデルとか統計法等については秋山先生、久原先生、桑先生、橋本先生で検討しておいていただく。

3.1.2 第2回開発WG委員会

(1) 開催日時：平成24年1月12日（木） 15:00～17:00

(2) 開催場所：オフィス東京 4階 L会議室

(3) 出席者

委員：林 慎一、油谷 浩幸、楠岡 英雄、久原 哲、桑 克彦、橋本 幸二、住谷 知明

経済産業省：村上一徳

国立医薬品食品衛生研究所：鈴木 孝昌、宮島 敦子

医薬品医療機器総合機構：水上 良明

産業技術総合研究所：千葉 靖典

事務局：木山 亮一、本間 一弘（産業技術総合研究所）

(4) 配布資料

資料1：第1回開発WG委員会議事録（詳細版案）

資料2：話題提供資料

「検体前処理における核酸抽出とその自動化—PSSの技術紹介—」住谷 知明氏
プレジジョン・システム・サイエンス株式会社

資料3：ガイドライン2007英語版

資料4：ガイドライン2010（日本語版及び英語版）

4-1：ガイドライン2010（日本語版）

4-2：ガイドライン2010（英語版）

資料5：審査WG関係資料

5-1：2010年度審査WG報告書「平成22年度次世代医療機器評価指標作成事業
テーラーメイド医療用診断機器（DNAチップ等を用いる遺伝子発現解析装
置）審査WG報告書：平成23年3月」抜粋（14～28ページ）

5-2：審査WGとの連携及び開発WG活動に関するメモ

資料6：DNAチップ開発ガイドライン検討資料

6-1：“DRAFT GUIDANCE: Pharmacogenomic Data Submissions”（August 24, 2007）
（翻訳版）

6-2：“DRAFT GUIDANCE: Pharmacogenomic Data Submissions”（August 24, 2007）

6-3：“SPIDIA Newsletter 10/2011”（October, 2011）（翻訳版）

6-4：“SPIDIA Newsletter 10/2011”（October, 2011）

6-5：“The MicroArray Quality Control (MAQC)-II study of common practices for the
development and validation of microarray-based predictive models.”Nat
Biotechnol. 2010 Aug;28(8):827-38.

(5) 議事概要

（ガイドライン2007年版と2010年版的説明）

・ガイドライン（2007）とガイドライン（2010）の確認。

（審査WGとの連携について）

・審査 WG との連携について説明。連携を強めるため情報のやり取りはしている。本日も審査 WG 事務局の方に参加していただいております、開発 WG 事務局も審査 WG の委員会に参加し、多少意見を述べている。それ以上のやり取りは議論があるところ。

・開発 WG との連携について。昨年度の報告書の中で、項目 I の評価指標案の中には、開発ガイドライン（案）として議論した内容も考慮されていることから、装置に関する内容についてはかなり連携がとれているのではないかと。

・開発 WG で行う活動についてはどういふことが考えられるか。開発 WG で議論するのは装置に関する性能。平成 19 年度には標準化ということも考慮して、標準仕様書の原案を作成した。この分野は国際標準化が進んでおり、ISO だけではなくて、アメリカは MAQC で DNA チップの標準化を進めようとしている。アメリカで DNA チップが開発されたので、開発した最初のものが一応基準になる。DNA チップで診断を行うためには、検体の精度、信頼性が大きく影響する。その技術的な信頼性をどう評価するかシステムづくりが必要。それは、装置の性能なので開発 WG で議論する内容。

・もう 1 点、MAQC で進んでいる標準化。例えば統計処理などのアルゴリズムに関する検討。診断するためにはどのアルゴリズムを使っても同じ結果が得られないとおかしい。実際はそのアルゴリズムによって違いが出てくる場合もあるので、きちんと考えておく必要がある。これも 1 つの検討項目。

・評価指標案と開発ガイドラインの内容の大きく食い違っている部分は何かあるのか。

・大きく違うところはないように思う。評価指標案の中には臨床性能評価に関する記述があるが、それ以外は装置に関してはほとんど同じ。特に厳しいということはない。

・開発ガイドラインがどんな形の位置づけになるか。

・あくまで開発側から、背中を押すような視点から何か独自性が出せないか。

・開発ガイドラインは、薬事審査を目標にしているわけではなくて、あくまでも企業の開発のときに参考にさせていただき強い味方になるべき。評価指標にあるのではないかという話になると、独自性がどこにあるのか。薬事審査とは違う観点は国際標準で、開発に対して制限がかかってくる可能性があり、開発側として議論する内容としても良いのではないかと。実際、本事業のミッションの 1 つは、標準化を目指すための資料としても使えること。

・標準化で、国際的に日本の技術をアピールしていくためには、日本で作られて日本の強みになっている、例えば検体の前処理のところを議論する。そこを取り入れた形のガイドラインかコメントの形で参考資料、公的な資料として出すことで、日本の企業の技術を支援することが可能になる。もう 1 つは、診断に関係する臨床性能評価という直接的な関係ではないにしても、アルゴリズムをどう使うのかは結構議論されている。MAQC-II の報告書では、いろいろなアルゴリズムを使っても同じ診断ができると言っている。そうすると、どれを使ってもいいのか。そこをきちんと企業に情報を与えることはポイントの 1 つ。

（具体的な項目について）

・評価指標案に対して、こちらから積極的に何かコメントや提言を出すのはそぐわない。むしろ審査 WG の資料を見て、述べられていないこと、あるいは曖昧な点を我々の 2010 年の開発ガイドラインのほうにコメントという形で追加・補強するようにしたらいいのではないかと。基本的には前処理に関する内容について、SPIDIA がだいぶ進んでいるので、もう一度見直して推敲して、

何か補強する所があればという議論。もう1つは、統計法、データ処理に関する部分について2010年案に何かプラスアルファのものを考えてもいいのではないかと。担当は、前処理に関しては住谷委員、油谷委員、楠岡委員と私（林座長）で見ていく。統計法とかアルゴリズムについては秋山委員、久原委員、桑委員、橋本委員で見ていく。

（検体前処理に関する議論）

- ・前処理のガイドラインの範囲。2010年ガイドラインでは抽出のことに关してはあまり触れていない。抽出を前提とした先の話。抽出に关しては、相当バリエーションが多いので、自動抽出機のガイドラインなのか抽出一般の話なのかで話は変わる。

- ・このガイドラインでは「検体からRNAを抽出・精製する方法について検討すること」ぐらいしか書いてない。あとはRNAの分解に注意するというぐらいで、RNAを精製したあとの品質のチェックのこととか、評価しか書いてないので、RNAの抽出に关してはほとんど触れられていない。自動でするのかマニュアルでするのか、その両方を含めた形で何か提言したほうがいい。ここの部分については若干のコメントを、それぞれの委員の意見を取りまとめて今年度報告として出すということによろしいか。

- ・オートマティックの場合に关してはもともと再現性を求めているプロセスなので、再現性やそのプロセスでどういう点に注意すべきかというのは記載できるが、マニュアルとなると対象が漠として、マニュアルでやった場合の結果のバリエーションをオートマティックにやったものと比較すると、そのような形しか出てこない。そうすると、オートマティックのほうも、バリエーションはもともとマニュアルと比較してという、鶏と卵みたいになる。何をするかをはっきりしておかないと、最初の抽象的に書かれているところを、さらに抽象的に書くだけで終わってしまう。

- ・やり方によって結果が違ってしまうので、本来なら統一しなければいけないが、「これにしろ」というのは無理がある。検査項目ごとにやり方を決めろということと言える。

- ・方法によっても信頼性の違いが出てくる。例えば、こういう方法で検定するのが望ましいとか、望ましいという強い言い方でなくても、こういう検定法があるという記載でもいいし、具体的にそういう記載をすることによって、開発する際に参考になる。さらに自動化についても記載する。基本的に自動化装置のほうで信頼性が高いという結果が出ている以上、それについてコメントしないのも変なこと。

- ・最終的には検体の前処理も含めてDNAチップの結果というのは評価すべき。

- ・これは検査システムと書いてあるので、全部になる。

- ・特別に1項目を付けて、例えば「RNAプロファイリングについては前処理が非常に重要になってくるので、同じサンプルを何度か前処理を含めてやることによって再現性を確めておく必要がある」という文言を入れるということを考えればいいのではないかと。マシンのほうがいいという推薦はできるかもしれないが、人でやっても同じことができればそれはそれで構わない。

- ・人だとばらつきがある。そういう情報がある以上、ガイドラインとしてはどれでもいいという言い方をするとガイドラインにならない。ある程度指標的なものが必要。

- ・例えば「同じサンプルで施設内で必ず同じ結果が出ることを確認する」という部分か、それに準ずるような記載を1つ付け加えておく必要はあるかもしれない。

- ・最初から機械化をすることを前提に組むという話のほうではないか。

・前の DNA のジェノタイピングのときには、ガイドラインの中に場所を変えてやるとか手を変えてやるというのを入れていたが、RNA のときにはそれを外した。再現性を見るというような項目に、DNA のジェノタイピングのときには 3 カ所でやれとか、3 人以上でやれというので再現性を見なさいというのが、たしか入っていた。RNA の場合は、特に前処理のところの再現性という意味を求める意味で、場所を変えてやるとか人を変えてやっての再現性というものを復活させる必要があると感じた。

・審査 WG では LDT を議論していたが、こちらは装置の開発ということであまり議論していないが、どこかの企業が自分のラボを作って 1 カ所でやるといった場合には、何箇所でもやるということが当てはまらないケースも出てくる。その場合には少なくとも 2 ないし 3 人が運転して同じ結果が出ればいい。

・それも考慮に入れて、もう少し具体的に文章化したほうがいいのではないか。前処理に関する内容については、住谷、油谷、楠岡委員と私（林座長）で次回までに素案みたいなものを作る。前処理の事情をいちばんご存じの住谷委員が中心になって、素案を作成していただくということによろしいでしょうか。

（統計法あるいはアルゴリズムに関する議論）

・統計法あるいはアルゴリズム等に関する再検討。秋山委員、久原委員、桑委員、橋本委員が担当。

・できるだけシンプルな表現でというところで、いまの表現でいいのかなと思う。秋山委員は発現解析のチップ開発をかなり進めている。一度確認したほうがいい。

（コメントの取りまとめについて）

・前処理と統計法に関してはコメントを考えていただく。装置とチップの一体化の部分について、資料を作っていただいて、それを委員に回して、コメントを加えられれば加える。

・では、その 3 点に関してご検討ください。次回までには、担当の委員全員の目は通した形で素案を事務局のほうに渡して、それで資料を作っていただく。

3.1.3 第 3 回開発 WG 委員会

(1) 開催日時：平成 24 年 2 月 23 日（木） 15：00～17：00

(2) 開催場所：オフィス東京 2 階 L 会議室

(3) 出席者

委員：林 慎一、楠岡 英雄、久原 哲、桑 克彦、橋本 幸二、住谷 知明
井浦 陽介（秋山 英雄委員代理）

講演者：嶋田 裕（富山大学）

経済産業省：早川 貴之

国立医薬品食品衛生研究所：宮島 敦子

バイオチップコンソーシアム：中江 裕樹、池田 純子

産業技術総合研究所：片岡 正俊、千葉 靖典

事務局：木山 亮一、本間 一弘（産業技術総合研究所）

(4) 配布資料

資料 1：第 2 回開発 WG 委員会議事録（詳細版案）

資料 2：話題提供資料

「診断 DNA chip への期待と問題点」富山大学消化器・腫瘍・総合外科 嶋田裕先生

資料 3：委託調査（JMAC）の中間報告資料

「遺伝子発現解析用 DNA チップ開発状況調査最終報告」

バイオチップコンソーシアム

資料 4：ガイドライン 2010 英語版（修正版）

資料 5：ガイドライン 2010 改訂版に関する討議資料

5-1：秋山/住谷委員による改訂版（全文：2 月 22 日分まで）

5-2：秋山委員による改訂版（修正箇所一覧：2 月 22 日分まで）

5-3：住谷委員による改訂版（修正箇所一覧）

5-4：桑委員による改訂項目及び関連する意見

（事務局と秋山委員：2 月 22 日分まで）

5-5：（回覧資料）IEC 62304:2006

（医療機器のソフトウェア管理に関する国際規格）

(5) 議事概要

・開発ガイドライン 2010 の改定版について討議をお願いする。ほぼ今日で固めたい。議論すべきところは 2 ないし 3 点。

（自動化に関して）

・自動化のところ。マニュアル操作による差は、診断ということ考えた場合に無視できない。意識的に項目名として「自動」という名前を入れずに、「再現性」という言葉にしたが、診断を考えた場合に、何らかの形でこれに言及する必要があるのではないか。自動化というよりも、機械化。やりなさいよと読める文章は適当ではない。

・同意見。確かに再現性イコール自動化ではないので、再現性というタイトルで項目を作るのは適当でないかもしれない。

・「トレーサビリティを確保可能な機構」とあるが、具体的にはどのようなことか。

・単純にバーコードリーダーとか、試薬のロットの記録だとか、検査者の記録だとか。

・トレーサビリティの場合は 2 つの意味があって、この場合は履歴管理ですね。

・誤解は防いだほうがいいので、履歴管理ということで。「自動」というよりは、「機械化」としたほうがいいだろうということも異論はない。自動化、機械化についてこの程度は触れておくことは必要。しかし若干強制的な臭いのする部分は削除ということでよろしいでしょうか。

・もともと自動化という話は、自動化すると人の手に起因する誤差が防げるというメリットがあるという議論が基になっている。機械化に伴うメリットを一文どこかに書いておくと、なぜこういう文章があるのかということがわかりやすい。

・ここに機械化を入れるのが妥当かというのが、ちょっと私にとってはわからない。「概要」とか、「測定装置」のいちばん最後とかに入れたほうがいい。あるいは 2.1 の「原理と構造」、あるいは 2.8 のようなところで、機械化を入れたほうがいい。

・この議論が出てきたのは全体の機械化というよりも、サンプル調製の機械化というところから出てきたので、2.4に収めておくほうがいい。外へ出してしまうと、計測全体の機械化という話に間違えられてしまう可能性がある。

・前回、試料の前処理をどうするかということで住谷委員に講演いただいて、その流れの中でこれが出てきたので、確かに全体の機械化の話をしているわけではない。サンプル調製に関することを明確にしておく必要がある。

・あくまでもサンプル調製に関する話だということがわかるようにする。

（「妥当性の検討」について）

・「妥当性の検討」。「検討する」をほぼ全体にわたって「妥当性を検討」に変えられている。

・方法の内容について検討することもある。妥当性を検討するというと、その方法がいいか悪いかを検討することになり、限定しすぎではないか。

・妥当性の検討に試験所間比較というのは、一般的に入らない。

・2つある。1つは新しい項目として2.4の(7)に「妥当性の検討」という項目、それに全体として、「検討する」というところが「妥当性を検討する」に変更されている。

・一般的には「妥当性の確認」というのは、意図したものに合致しているかどうかを確認するという意味。得られた結果を評価する話ではない。だから、評価とは本質的には意味が違う。評価は verification に近い。

・調製者間の比較とか、試験所間の比較というのは、測定装置の妥当性の検討としては合わない。

・調製者間比較、試験所間比較というのは、ここの場所としては適当でないだろうということで、除く方向で事務局で作成してください。

・全体にわたって「妥当性を検討する」という文言に「検討する」を置き換えている点については、事務局で案を作って、それを見ていただく。

・8ページのいちばん下の最後の「不確かさの評価」というのも、現時点で難しい。

・2項の「妥当性の評価」というのは、2.4の下にぶら下がると。2.8なら、何となく装置の中の位置づけとしてはいいが、2.4だと違和感がある。

・では、2.8として独立させて書く。2.「測定装置」の最後のところに持ってくる。

（「ソフトウェア」について）

・9ページの「ソフトウェア」。合同検討会の打合せのときにソフトウェアの管理に関しては国際規格があるので、それを引用したほうがいいのではないかという話が出た。IEC62304を回覧するので見ていただき、引用を入れることを提案した。

・実際にこういう国際規格があるということで、ソフトウェアの管理上の問題で事故もあったそうなので、こういう国際規格ができた。よろしいでしょうか。

（異議なし）

（「装置とチップの一体化」について）

・「装置とチップの一体化についてのコメントがあったほうがいいのではないか」というご意見。それに従って簡単なガイドラインに加える文章を作った。

・臨床検査用の診断用装置として日本で取り扱う場合は、薬事法の対象。日本が先進諸国の中で唯一、試薬と装置を別に分けて審査をしている。GSTFというところでは、全部一体化してやり

なさいということになっていて、例えば DNA の解析装置は、例えば FDA ではクラス II というのは実はチップも込みになっている。ところが日本は、チップはチップ、装置は装置ということで、別々に取り扱われている。そうすると、チップだけを作る会社があとからどんどん出てくると、どうやって評価するのですかということになる。チップだけを作る会社がチップをどんどん売って、装置は適当にユーザーが選んで使いなさいということになって、それで性能はどういう形で validation されるのかということが問題になる。いまは法律上仕方ないにしても、将来のことを考えると、GSTF に従って測定システムとしてやるということが必要。

- ・ 遺伝子型判定用の DNA チップに関する評価指標の例。これは薬事申請のときの話で、私たちが議論しているのは一体化して評価したほうが装置としての精度が上がるのではないか。薬事審査をどうこうするという話ではない。精度管理のために一体化した形で、評価したらどうでしょうかということ。

- ・ この文章を装置の validation、精度管理というところに入れたらどうか。

- ・ 例えば我々が使っているような研究の場合には、Affymetrix と Agilent の例があつて、Affymetrix の場合には装置と一体化して使うが、Agilent はいわゆるオープンプラットフォームのような形で、何にでも使っていていいし、レーザースキャナはどれでも使える。使い勝手がよくて汎用しているが、診断用としてもそういう可能性もある。それを評価できないから、このガイドラインの中からは外すというわけではないでしょうけれども。

- ・ 診断用の場合は国によって法的な根拠が違って、例えばアメリカで医療事故が起きた場合は、メーカーの測定システムの指示に従って起きたエラーはメーカーが責任を持つ。日本はユーザーの責任において装置と試薬を選ぶので、それで起きたエラーはユーザーである医療機関が責任を持つ。医療はルーチンワークになり、研究ではないので、個人の力量に依存した形というのは非常に難がある。

- ・ 薬におけるジェネリックとの関係みたいなもの。薬の場合は、ジェネリックメーカーが出すときには生物学的同等性ということだけを出せば OK。もし同じことを考えるのなら、後発のチップを出すところは先発と同じ性能であるということを証明しないと、チップだけ売ればいいという話にはならない。そこは一体化して評価すること、要はチップは別メーカーが作ってもいいけれども、それが後発として承認を取るときには一体化して評価を受けなければいけないということ。

- ・ 確かにこれは「一体化した状態での性能を規定し、その信頼性を評価するかたちが求められる」ということで、非常にマイルドな言い方で妥当かなと思う。ガイドラインが医療機器を頭に置いて作られているので、確かにそういう指摘はごもっとも。では、これはほぼ桑先生の原文どおりを加えるということではよろしいでしょうか。

- ・ 「測定システム」という項目で、1.5に入れる。

3.2 話題提供

3.2.1 話題提供 (1)

山本伸子氏（特定非営利活動法人バイオチップコンソーシアム研究部主任研究員）による話題提供（第1回開発ワーキンググループ委員会：平成23年11月16日）。演題：「遺伝子発現解析用 DNA チップ開発動向について」

- ・昨年「遺伝子発現解析用 DNA チップの開発動向について」調査を担当。その後の情報を話したい。調査したガイドラインは、アメリカ FDA を中心に RT-PCR 用の前処理ガイドライン、IVDMIA のガイドライン案、乳がん予後予測のガイドライン、PGx データの提出ガイドライン、経済産業省の遺伝子型検定用 DNA チップ、厚生労働省の遺伝子型判定用 DNA チップ、OECD の遺伝形質の分子遺伝学的検査のための GLP。

- ・国内企業に対するヒアリング。現在の開発状況、申請で困っていること、ガイドラインに期待することを調査。メーカーは、東レ、東芝、東洋製罐、DNA チップ研究所、横河電機、SRL。一致した要望としては、内容は普遍的、一般的な必要要件を記載してほしい。細やかな規定、絶対値、具体的な数値基準は要らない。厳しすぎると参入の障壁になるし、弛すぎると開発意欲を阻むので、数値の限定はしてほしくない。要望の例としては、再現性、チップだけではなくプローブ、標準物質の品質。有効測定範囲、チップ品質の評価尺度。レポートについて必要十分な記載項目。遺伝子検査が承認されない形で、実費でやられているケースが増加してきていて、この辺をどう考えていくのかが今後の課題。

- ・最近の動向。FDA ではガイダンスは法律や規則を補完するための個別の課題に対する考え方を示すもので、法的拘束力はない。ただし申請する場合にはこれに準じて書く。案として公示され、意見を求めて、最終的に広く発行されるというプロセスを踏む。IVDMIA ガイドラインは、反対が多くて正式に発行されていない。MammaPrint の承認後、Pathwork や AlloMap、Ovarian Cancer Testing という4つが、IVDMIA として FDA 承認されたが、これらも LDT であり、LDT は基本的には FDA の管轄外で CMS の管理下にある。FDA は管轄したいので、このガイドラインを廃棄して、代わりにこの全体を規制することを考えている。

- ・ISO では体外診断薬や GMO 検出の標準化が進んでいる。バイオチップコンソーシアムが中心になり新しくニューワークアイテムプロポーザルを行い、いま CD 段階。10 月末には、バイオテクノロジーの新しい TC を創設しようという動きがある。

- ・SPIDIA は欧州の標準化機構によるコンソーシアムで、7つの公共機関が入り、8つの民間研究機関が入って、2008 年から 2012 年までの時限プロジェクト。対象は、体外診断用の前処理ツールプロセスの改善及び標準化で、品質保証スキーム・ガイドラインの確立を行おうとしています。特に、組織、血液サンプルの安定化をはじめとする技術革新を中心にやっております。PAXgene がいろいろなところに登場する。PAXgene を中心とした標準化が狙われているのではないかと。

(質疑応答)

○IVDMIA のガイドラインの中にオンコタイプ DX が含まれていないのはなぜか。

○FDA 承認されていない。FDA は全体の LDT をもう少し規制したいという意思はあるが、クリアラボが結構強い。

○アメリカでの普及に FDA の承認は必ずしも必要ないということか。

○そうです。

○ガイドラインの中に Breast Cancer を対象としたものがあるが、なぜ乳がんというように特化したものになっているのか。今後対象が変わるごとにそれぞれガイドラインが必要になってくるのか。

○FDA は承認するためにまずガイドラインを作って、それをベースにほかが続く。いま審査をしなければいけないものがそれだったからということではないか。

3.2.2 話題提供 (2)

住谷 知明氏（プレジジョン・システム・サイエンス株式会社）による話題提供（第 2 回開発ワーキンググループ委員会：平成 24 年 1 月 12 日）。演題：「検体前処理における核酸抽出とその自動化-PSS の技術紹介-」

- ・会社の概観。開発型ベンチャーであり続けたいという願望を持っている。もともとは検査会社に対して免疫検査システムを納入していた。20 年ぐらい前に磁気ビーズの技術に到達、DNA 抽出に適用すると非常にヒットして、世界各国に OEM して成長した。当初はスピンカラムという技術はなかった。分注機のチップの先端を少し細長くして、そこに磁石を当てて回収する技術。細いところでトラップすることで回収効率が非常に上がった。ビーズの表面に官能基を付けることによりいろいろな用途が期待できる。自社ブランド製品と、Roche と QIAGEN を中心に海外 7 社と OEM 契約。

- ・発現解析用の検体の前処理は RNA 抽出。現在の RNA 抽出法は有機溶媒法と固相法とに分けられる。2004 年に、イギリスの National Genetics Reference Laboratory が「Automated Extraction Methodologies」という、核酸自動抽出機の比較レポートを出している。これは DNA が対象で、核酸抽出の自動機に絞っている。目的は自動機の普及。System type、Chemistry、Dimensions 云々と非常に細かく項目をリストアップ。評価項目としては収量、純度、Presence、Integrity など。PCR できるか、コンタミはないかという評価。収量と純度は OD260 と 280 の比で見る。収率や分解を確認。Cross contamination も検討。

- ・結果としては、ソリッドフェイズ（メンブレン）が純度としては良い結果。しかし、詰まりなどによる採り残しがあることと、バキュームポンプにときどき問題が起きる。全体としては磁気ビーズを使ったものが非常に簡単で、使い勝手が良い。

- ・RNA に関して。磁気ビーズ法による抽出と Qiagen 社のスピンカラムとどう違うのか。性能検定ではほとんど差は無かった。

- ・遺伝子発現解析における検体処理における問題点。サンプル調製が非常に重要。「NATURE BIOTECHNOLOGY」に出ている例では、5 カ所のラボで同じサンプルを実験、あるサンプルに対して違いが 2 倍以上あるものの数を見た。ラボが違うと、極端な例は 400 以上の遺伝子で実験間の差が出た。サンプル調製が非常に重要。

- ・誰がいつやっても同じ結果を出そうと思ったら、やはり自動化というのは考えなければいけないのではないか。診断に必要なのは、誰がいつどこでやっても一定の結果が得られる再現性が必要。人為的なミスは許されない。

- ・ DNA チップの前処理、DNA チップに掛ける直前までの全自動装置を開発した。遺伝子の抽出技術と、酵素反応を合体して 1 つの装置にした。自動化すると約 5 時間ハンドフリーの時間ができる。さらに cRNA 作成も自動化でやると大幅な省略ができる。
- ・ 実際に Affymetrix が検定した。HeLa と MCF-7 で実際に確かめてみた。スキャッタープロットで見る限りあまり差がない。
- ・ もう 1 つ自動化の効果を紹介。エピジェネティクスで起こった非常に面白いデータ。ChIP と MeDIP をやっていて、それぞれ自動化した。ChIP をマニュアルと機械でやったものとを比較。機械でやると、非常に揃った結果が出る。初心者がやると差が出る。機械化の優位さを現している。考えているのはワンボタンで試料調製から結果まで出すものの開発。

3.2.3 話題提供 (3)

嶋田裕先生（富山大学 消化器・腫瘍・総合外科教授）による話題提供（第 3 回開発ワーキンググループ委員会：平成 24 年 2 月 23 日）。演題：「診断 DNA chip への期待と問題点」

- ・ 富山大学嶋田裕先生「診断 DNA chip への期待と問題点」。
- ・ 本日の内容。研究を開始した背景、予備研究、診断チップへの取組み。最後に医療現場として問題点について。
- ・ 2003 年の食道癌の全国統計：5 年生存率 36%、10 年生存率 25%。1999 年の全国調査：手術死亡 25 名、在院死亡 35 名。手術で亡くなる方が 3.6%もある。
- ・ 患者の背景も含めた治療予後の評価。マイクロアレイの判別で、臨床検体を使って、Artificial Neural Network と線形判別分析を用いた予後予測を 2005 年に報告。1 年と 5 年生存予測。1 年は病気の進行度がかなり重要。5 年では糖尿病があるか、肝臓の善し悪し、呼吸状態、年齢などの要因が入る。したがって、臨床の予後解析やリンパ節転移予測には、癌細胞の発現解析のみならず、間質反応、生体免疫反応、個体本来の合併症などを総合的に加味しないといけない。こういう個別化治療に DNA 診断チップを使えないか。
- ・ 「診断 DNA チップへの取組み」。食道癌で個別化治療に有用な情報はリンパ節転移。化学療法、放射線療法、手術をどのようにするか。そのために治療前には生検標本で診断。生検標本は 1mm から 2mm ぐらい。腫瘍の一部が本当に腫瘍を代表するかどうか。それを測るための高感度チップが必要。2006 年に報告された東レが開発したチップによる生検標本からの解析アルゴリズムを作成。
- ・ 生検診断のための解析法。良質の RNA でいい検体であるか、癌か正常かを判定。癌と判定された検体で新型チップで高感度に検出するというストラテジー。Reference チップを使って、最終的に生検サンプルを DNA チップで解析。20 遺伝子で予測。Cancer と Non-cancer で明らかに差がある。
- ・ 生検検体では大体 95%は合う。癌であるかないかはチップでわかる。癌由来の RNA が 60%ぐらいあれば正しく判別。食道癌の別のところから採ったサンプルが果たして同じか。結果は、clustering をするとほぼ全員で同一患者は同じ所に clustering された。90%以上は使える。
- ・ チップを使ってリンパ節転移予測の多施設の共同研究を行った。他施設のサンプルを京大に送付して解析。搬送システムは 2 種類。1 つはクライオチューブに入れるときに RNA データを入

れて、4℃の冷蔵庫に保存し、-20℃の冷凍庫に保存。もう 1 つは速やかに-80℃ “液体窒素。どちらかに統一しなければいけない。

- ・得た結果の validation。画像診断で正しく判定していたものは、マイクロアレイ試験をやるとほぼ正しい判断をする。トータルでは、リンパ節転移があるという正確な診断は 3 人に 2 人。マイクロアレイで 5 人に 4 人ぐらいに精度が上がる。画像診断を補完できるのではないかな。

- ・なぜ遺伝子解析が画像診断を上回ったのか。リンパ節転移の予測。小さなマイクロメタスターゼがあった。マイクロアレイを使うと、実際の画像で出てこない微小転移を存在予測することが可能になる。画像診断では 5mm のリンパ節までが限度で、マイクロメタスターゼはわからない。したがって、マイクロメタスターゼまで含めた解析となると DNA 診断チップがおそらく有効。

- ・既にあるサンプルはホルマリン固定標本。以前は DNA しかできなかったが、最近は MicroRNA が解析できるようになった。ホルマリン固定標本使用の利点は、一般病院で作成可能、臨床データが付随している、長期にわたる癌の経過がわかる。MicroRNA なら変性が少ないので発現解析が可能。なお、使ったチップは東レの MicroRNA のチップ 3D-Gene。チップ間の高再現性と RT-PCR との高い一致率がある。データの再現性では、東レのチップはいちばん良いデータを出した。PCR との一致率は、東レのチップで 8 割ぐらいで高い。肝臓、前立腺で高い一致率。

- ・ホルマリン標本で問題は、ホルムアルデヒドによる cross-linking と RNA の変性。72 時間でホルマリン架橋する。保存しておくとも RNA はどんどん分解し、約 5 年になるとほとんど分解される。しかし、MicroRNA であれば評価可能。

- ・術後補助化学療法についても検討。再発するしないに関係する MicroRNA が実際に検出された。Clustering すると、不再発と再発の患者を 8 割程度判別。現在、継続中。

- ・食道癌についても解析。胃癌に比べると食道癌は、大体 3 分の 1 か 4 分の 1 の頻度。固定標本の使える RNA を調べると、トータルでは 50%。904 個の MicroRNA から発現差のある 63 個を見つけた。

- ・最後に、医療現場における問題点。いろいろな検体。手術場、内視鏡室、病棟からの採血など。病棟からどうやって解析の所まで持っていくかが問題。一時保存の場所もない施設もある。研究者がいるか、いないか。冷凍庫、液体窒素が普通にあるかどうか。ホルマリン固定をどうやるか。我々は 48 時間以内に固定標本を作成して冷暗所で保存。こうやらないと使える検体にならない。もう 1 つ、同じ手術ができていないか。臨床応用には、臨床医、看護師、パラメディカル、事務員の理解・協力が不可欠。また、医療の質、手術、化学療法の質も考慮しなければならない。いちばんの問題はモチベーション。お金の問題、保険の問題がかかってくるとモチベーションが上がらない。しかも、結果判定までの時間も問題。

- ・提言。DNA チップの作成には臨床データの検証が不可欠。過去の数多の臨床試験の検体を有効利用すべき。ただし、倫理委員会の承認が必要、患者又は家族の承認も必要。今後の臨床試験では、すべての病理に回す標本の遺伝子解析の承認を取っておいてはどうか。ゲノム解析ではなくて発現解析なので、比較的容易ではないか。

(質疑応答)

○ホルマリン固定が 10 日以上のもものは除外し RNA の質を検定するが、MicroRNA の質の検定というのは、具体的にどうやるのか。

- 架橋が多いものを除外した。MicroRNA の質の検定方法はない。
- メッセンジャーの質のチェックに使うような RNA アナライザーはどうか。
- それも使っている。電気泳動とアナライザーの両方。
- ホルマリン固定までの時間やホルマリンに漬けておく時間が施設間でバラバラ。教育も非常に大事。MicroRNA に絞るとするのは素晴らしいアイデア。
- 診断用 DNA チップの開発だが、薬事申請計画はどうか。
- 3D-Gene を使って 100 以上の検体を集めてやっている。実際の化学療法の感受性予測のチップを作って、それで予測できるものを最終的に申請する方向。

3.3 委託調査

本項では、遺伝子発現解析用 DNA チップに関するガイドラインの策定に関係する企業の開発動向、国内外のガイドラインや標準化動向などについて、バイオチップコンソーシアムの委託調査報告書「平成 23 年度委託研究遺伝子発現解析用 DNA チップ開発状況調査」の概要を示す。報告書は参考資料 5 として掲載した。

- ・バイオチップコンソーシアム事務局長中江氏「遺伝子発現解析用 DNA チップ開発状況調査最終報告」。
- ・チップ測定に関するガイドラインの調査。FDA からコンパニオン診断薬に対するガイドラインが 7 月の半ばに出た。FDA のベネフィット・リスクのドラフトが 8 月半ばに出された。FDA は診断薬メーカーの監視・管理を強化したい。ヨーロッパもゲノムバイオマーカーの臨床試験のガイドライン、3 局でジェノミック・バイオマーカーの本格的な取扱いが開始。アメリカは CLIA と FDA の対決色が強くなった。
- ・サンプルの品質。日本では JCCLS が進めており、検体の品質管理マニュアル承認版が昨年末に出された。そのほかには OECD や CLIA はガイドラインを出した。
- ・7 月に出たコンパニオン診断薬のガイドライン。ケミカル承認をする部署、生物製剤の承認をする部署、IVD を承認する部署の 3 つが同時にこれを作って出した。医薬品と診断薬の両方の承認申請を出しなさい、両方の添付文書への記載をしなさいと。その代わり、開発時に治験薬として同時に IVD も臨床性能評価をやってもいい。
- ・対象となるのは、医薬品の開発者、診断薬の開発者。定義、管理する理由を明確にした。「コンパニオン診断薬の定義」。1.特定の治療薬によって利益を享受されると考えられる患者を同定するもの、層別化と言われるもの。2.特定の治療薬による治療の結果、重大な副作用のリスクが増大すると考えられる患者を同定するもの。3.安全性と薬効を向上させるための、治療の最適化を目的とした治療に対する反応のモニター。この 3 点にとって必須であるものをコンパニオン診断薬と呼ぶ。
- ・「アメリカではバイオマーカーの申請は医薬品と同時に出すのですか、それとも独立で出しているのですか」という質問を受けた。この中にはっきり「両方ある」と書かれている。
- ・「ベネフィット・リスク」。ベネフィット・リスクのガイドラインは、診断薬それぞれに関して、FDA が個々のガイドラインを決めるのではなく、医療機器の市販前の承認申請においては、

ベネフィットとリスクをどう評価して、その評価に合わせて申請の仕方を決めなさいというガイドライン。これの背景は、患者にとって大きなリスクを負うような結論が出るものは、きちんと臨床試験をやって申請をしなさい、そうでないものは 510K で申請しなさいということ。

- ・ IVDMIA というガイドラインが、2、3 年前に出されたが、正式版が出ないままになっている。それをこのベネフィット・リスクに置き換えている。たぶんこれからは IVDMIA のような診断機器・プラス・アルゴリズムのパターンの診断薬は、このベネフィット・リスクのガイドラインに合わせて評価をしていくことになるのではないかと。ベネフィット・リスクは、安全性のデータと効果のデータとのバランスで評価。

- ・ このようなガイドラインが出されたのが、昨年から今年で変わってきたこと。企業ヒアリング、たくさんの会社にアンケートを実施した。匿名でいいことにした。結論として、ガイドラインに期待する人の意見が多い。一致した意見として、普遍的なもので、厳しすぎるものはやめてくださいと。それから再現性や外部委託合成品の品質基準、有効の測定範囲、チップの品質の評価尺度、プロセスレポートの記載項目等についてはサジェスションをくださいという意見。

- ・ いちばん注目を集めているのは SPIDIA というプロジェクト。ヨーロッパでキアゲン社が中心の 4 年間のプロジェクト。アカデミアを中心に試験が行われており、予算額は約 13 億円、ヨーロッパから 9 億円が補助。品質の管理の実験で、ヨーロッパの標準化団体 CEN と共同で標準化を進めている。サンプルとしては血清のプラズマ中の DNA、RNA の品質管理をやったが、サンプルを作るときにキアゲンの試薬を使いなさいという。もう少し経つと、具体的な結果が出てくる。

- ・ CEN は、ISO に提案できるので、日本やアメリカが議論に入れないまま国際標準になってしまうのではないかとこの疑念があった。それはやらないと明言。

- ・ アメリカのシリコンバレーで 5 社ほどインタビュー。アメリカは次世代シーケンサーばかりでマイクロアレイが下火になっているのではないかと考えていたが、RNA メーカーは希望を全く捨てていないで、FDA 承認の準備を進めていた。

- ・ ヨーロッパは、バイオカーチスという新しいタイプのマイクロアレイを作っている会社。既に FDA に相談に行っている。

- ・ 次世代シーケンサー。MAQC はもともとマイクロアレイのクオリティーコントロール、最近皿になり、次世代シーケンサーの標準化を進めている。イルミナと SOLID と Roche の 454 を使って、標準化を進めている。

- ・ まとめ。国内外のガイドラインに関しては、FDA はコンパニオン診断デバイス、ベネフィット・リスク評価基準のガイドラインが出て、整備しつつある。個別化医療の実現に向けた動きが活発になっている。取扱いについても薬事に対応してきている。日本では検体管理のマニュアルができて、標準化に一石を投じている。JMAC でも JCCLS と共同で、臨床検体の品質管理、チップのシグナルまでの統一した品質管理の研究開発をスタートした。

3.4 欧米における DNA チップ関係の規制及び報告書

3.4.1 米国 FDA によるガイダンスの例 1（翻訳文）

第 1 回開発ワーキンググループ委員会の資料（平成 23 年 11 月 16 日）として、FDA が公表した以下のガイダンス草案文書を配付した（本資料は平成 22 年度に翻訳配付した資料であるが本年度も必要なため配付した）。

「クラス II 特別規制ガイダンス文書：乳癌の予後のための遺伝子発現プロファイリング試験システム：2007 年 5 月 9 日」“Class II Special Controls: Gene Expression Profiling Test System for Breast Cancer Prognosis” (May 9, 2007)

クラス II 特別規制ガイダンス文書：「乳癌の予後のための遺伝子発現プロファイリング試験システム」文書発行日：2007 年 5 月 9 日

本書に関する質問については、Reena Philip へ問い合わせのこと。

（電話：240-276-1286 又は電子メール：reena.philip@fda.hhs.gov）

米国保健福祉省食品医薬品局医療機器放射線衛生センター

免疫学・血液学用機器部体外診断用機器評価・安全事務所

前書き

書面による意見や提言は、当局の検討材料としていつでも、Division of Dockets Management, Food and Drug Administration（食品医薬品局案件管理部）、5630 Fishers Lane, Room 1061, (HFA-305), Rockville, MD, 20852 宛に提出してよい。或いは、<http://www.fda.gov/dockets/ecomments> 宛に電子媒体にて意見を寄せていただいても構わない。意見は全て、案件整理番号 2007D-0137 として特定願う。寄せられた意見については、当該文書が次に改正又は更新されるまで、当局による決定が下されない場合がある。

複本

複本は、<http://www.fda.gov/cdrh/oivd/guidance/1627.pdf> にてインターネット経由で入手可能である。また dsmica@fda.hhs.gov 宛に電子メールにてガイダンスの電子コピーを請求する、若しくは 240-276-3151 宛にファクシミリにてハードコピーの送付を請求してもよい。請求の際は、文書番号 1627 として請求対象のガイダンスを特定願う。

目次

1. 序文
2. 背景
3. 適用範囲
4. 健康へのリスク
5. 機器の説明
 - 使用目的
 - 試験方法
 - 試験アルゴリズム

試験結果

6. 性能特性

分析前因子

品質管理

分析性能

臨床的妥当性確認

7. ソフトウェア

8. ラベリング

(本文)

産業界及び FDA 職員向けガイダンス

クラス II 特別規制ガイダンス文書：乳癌の予後のための遺伝子発現プロファイリング試験システム

本ガイダンスは、この主題に関する食品医薬品局（FDA）の現在の考えを示すものである。これは何人のための権利、或いは何人に対する権利も創出又は付与するものではなく、また FDA 或いは一般市民に義務を負わせる働きを有するものでもない。ある代替的アプローチが、適用可能な制定法や規制の要件を満たすものであれば、それを利用してもよい。代替的アプローチについて議論を希望する場合、本ガイダンスの履行に責任を負う FDA 職員へ連絡されたい。適切な FDA 職員を特定できない場合、このガイダンスのタイトル頁に記載の電話番号へ問い合わせのこと。

1. 序文

本ガイダンス文書は、乳癌の予後のための遺伝子発現プロファイリング試験システムをクラス II（特別規制）へ分類することを裏付けるための特別規制として作成された。乳癌の予後のための遺伝子発現プロファイリング試験システムとは、同義遺伝子の RNA 発現水準を測定し、そしてこの情報を統合して、従前に診断された乳癌の予後の支援となるシグネチャー（パターン又は分類子又は指標）を得るための機器を指す。

本ガイダンスでは、乳癌の予後のための遺伝子発現プロファイリング試験システムの市販前届出及びラベリングに関する、製造者向けの勧告を提示する。本書に記載の勧告は、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）や遺伝子発現マイクロアレイなど、癌の予後に利用される RNA アッセイに適用可能である。乳癌の予後のための遺伝子発現試験システムにおいては、医師が臨床病理学的因子と併せて癌の再発（遠隔転移など）リスクを評価する際に予後マーカーとして利用できる結果を得るための測定に適用される。

この種の予後試験は、生物学的特徴（例：特定の疾患進行段階に達した 50 歳以上の女性）、或いは以前から定義されている処置（例：術後補助治療を受けていない女性）など、予め定義された一連の特性が似通った患者について、試験結果が転帰の変動の説明となる類の試験である。

乳癌の予後のための遺伝子発現プロファイリング試験システムは、診断、或いは治療法に対する応答の予測や検出、或いは患者にとって最適な治療法の選定を意図するものではない。本ガイダンスでは予測マーカーは取り上

げない。これは予後マーカーと明確に区別され、何故なら予測マーカーは治療法に対する応答を予測するものだからである。¹

本ガイダンスは、乳癌の予後のための遺伝子発現プロファイリング試験システムの分類を公表する Federal Register（連邦広報）での通知と併せて発行される。乳癌の予後のための遺伝子発現プロファイリング試験システム向けの 510(k)市販届出を提出する企業は、この特別規制ガイダンスで対象とされる問題点への対応を要することとなる。ただし、係る企業は自社の機器がガイダンスの要件を満たす旨を提示する、或いは別な方法で安全性及び実効性の保証に相当するものを提供するだけでよい。

FDA のガイダンス文書は、本ガイダンスを含め、法的強制力のある責任を規定するものではない。むしろ、ガイダンス文書はある主題に関する当局の現在の考えを記述するものであり、特定の規制要件或いは法的要件に言及していない限り、単に勧告と見なすべきである。当局のガイダンスにおいて、should（～すべきである）という語句の使用は、何らかの提言或いは勧告ではあっても要求事項ではないことを意味する。

最も負担の少ないアプローチ

本ガイダンス文書で特定される問題点は、機器が市販可能となる前に対処すべきであると当方が考えるものに相当する。ガイダンスの作成に当たり、当方は当局の意思決定に対する関連の法定基準を入念に検討した。また当方は、ガイダンスの遵守及び当方が特定した問題点への対処を試みる際に貴殿が負うと思われる負担についても検討した。当方としては、ガイダンス文書において提示される問題点に対処するための、最も負担の少ないアプローチを検討したと考える。しかし、問題点に対処するための、さらに負担の少ない方法があると考えれば、「最も負担の少ない問題解決のためのアプローチ案」の文書に概要が記されている手順に従うべきである。この文書は当センターのウェブページ、<http://www.fda.gov/cdrh/modact/leastburdensome.html> より入手可能である。

2. 背景

FDA は、特別規制は、一般的な規制と併用した場合、乳癌の予後のための遺伝子発現プロファイリング試験システムの安全性と実効性を合理的に保証するに足る、十分なものとなるであろうと考える。この一般的な型の機器の市販を意図する製造者は、以下の事項を行うべきである：（1）21 CFR 807 のサブパート E に記載の市販届出要件を含め、連邦食品・医薬品・化粧品法（以下、「当該法」という）の一般的規制に従うこと、（2）本ガイダンスで特定される、当該機器に関連する特有の健康上のリスクに対処すること、及び（3）機器の市販に先立ち、実質的同等性判定を FDA から取得すること。

本ガイダンス文書では、乳癌の予後のための遺伝子発現プロファイリング試験システム向けの分類規定及び製品コードを特定する（第 3 節「適用範囲」参照）。加えて、本ガイダンス文書の他の節では健康へのリスクを特定し、諸対策について記述するが、その対策は、製造者がそれに従い、一般的規制と併用されれば、乳癌の予後のための遺伝子発現プロファイリング試験システムに伴うリスクに概ね対処し、また時宜に合う市販届出

（510(k)）の審査及び認可に結び付くことになる。本書は、市販届出の提出書類における特定の内容要件に関する FDA の文書を補完するものである。また 21 CFR 807.87 及びその他、この主題に関する「市販届出：

510(k)」等の FDA 文書も参照すべきである。係る文書は <http://www.fda.gov/cdrh/devadvice/314.html> より入手可能である。

市販前届出 510(k)には、FDA へ提出可能なものとして通常版、特別版及び簡易版の 3 種類がある。特別版及び簡易版の 510(k)方式は、510(k)の審査過程の合理化に役立つよう考案されたもので、「新 510(k)パラダイム - 市販前届出における実質的同等性の立証。最終ガイダンス」 (<http://www.fda.gov/cdrh/ode/parad510.html>) に説明が掲載されている。簡易版 510(k)は、FDA 公認の合意規格、特別規制、又は FDA ガイダンス文書を信頼することにより、510(k)に記載のデータの審査を簡略化する手段を提供すると共に、新しい機器の実質的同等性を実証する負担を最小限に軽減する手段にもなる。簡易版及び通常版の 510(k)の内容及び形式に関するガイダンスは、<http://www.fda.gov/cdrh/ode/guidance/1567.html> に掲載されている。また付加的情報については、当該法の第 514(c)(1)(B)節、並びに FDA ガイダンス「実質的同等性の判定における規格の用途」

(<http://www.fda.gov/cdrh/ode/guidance/1131.pdf>) も参照のこと。特別版 510(k)は、認可済みの自社製機器の変更を検討している製造者向けに用意されている。特別版 510(k)の作成方法に関する情報は、<http://www.fda.gov/cdrh/devadvice/3144.html> より入手可能である。

3. 適用範囲

本書の適用範囲は、21 CFR 866.6040 の記述通り、以下の機器に限定される（製品コード NYI）。

21 CFR 866.6040 - 乳癌の予後のための遺伝子発現プロファイリング試験システムとは、同義遺伝子の RNA 発現水準を測定し、そしてこの情報を統合して、従前に診断された乳癌の予後の支援となるシグネチャー（パターン又は分類子又は指標）を得るための機器を指す。

従来、予後という言葉は、処置を施されていない患者（本書の文脈で言えば、術後補助治療を受けていない患者）を指す。しかしながら、単一の治療法しか受けない女性（例：エストロゲン受容体（ER）陽性となり、タモキシフェンだけで治療を受ける女性）のために、予測される転帰に関する情報を提供することは、乳癌の予後の面で臨床的有用性もあり、本ガイダンスの適用範囲に該当する。

乳癌の予後のための遺伝子発現プロファイリング試験システムは、臨床多重試験システム用の計装が必要となる可能性のある試験である。臨床多重試験システム用の計装は、21 CFR 862.2570 の規制対象である。係る計装に関するガイダンスは、FDA の「産業界及び FDA 職員向けガイダンス：クラス II 特別規制ガイダンス文書：臨床多重検査システム用計装」²に掲載されている。貴殿が扱う乳癌の予後のための遺伝子発現プロファイリング試験システムに、そのアッセイ向けの臨床多重試験システムが含まれる場合、当該のアッセイ及び計装双方に関する情報を、単一の 510(k)にまとめて提出してよい。計装機器の製造者が計装についてのみ 510(k)を提出することを望む場合、アッセイに関する市販前届出と併せて 510(k)を提出してよい。

4. 健康へのリスク

乳癌の予後のための遺伝子発現プロファイリング試験システムは、乳癌患者の臨床評価に役立つ予後情報の提供が目的である。この機器が適応症に応じて機能を果たすことができなければ、誤った試験結果に結び付くおそれがある。偽陽性の結果は患者をリスクが高い方の集団に誤って区分することに結び付き、また偽陰性の結果は患者をリスクが低い方の集団に誤って区分することに結び付く。癌再発リスクを誤って区分すると、心理的苦痛を伴う不的確な予後、不正確なカウンセリング、次善的な患者の世話に結び付くおそれがある。

下記の表に、FDAはこの機器の使用に際し全般的に伴う、健康へのリスクを特定した。特定されたリスクについて推奨される軽減対策を、下表に記載の通り、本ガイダンス文書で記述する。市販前届出を提出する前に、貴殿の機器特有の別なリスクも全て特定するため、リスク分析を実施すべきである。リスクは、用いられる発現アッセイの種類、試験の目的、試料の種類、結果の利用形態に応じて変化し得る。市販前届出において、リスク分析手法について説明すべきである。本書で特定されるリスクに対処するための代替アプローチを用いる場合、或いは本書に記載のものとは別のリスクが特定された場合、そのリスクに対処するため貴殿が用いたアプローチを裏付ける、十分な詳細情報を提示すべきである。

特定されたリスク：

- ・試験が適切な性能を発揮できないこと、例えば試薬、計装、データ管理、或いはソフトウェアの不具合が原因で結果が不正確であったり結果が出なかったりすると、偽陽性又は偽陰性の結果や、不的確な予後を招くおそれがある。
- ・試験結果を適正に解釈できないこと

推奨される軽減対策：

- ・第6節及び第7節
- ・第5節（「試験結果」の節参照）及び第8節

5. 機器の説明

510(k)提出書類において、規定、製品コード、及び合法的に市販されている属性機器を特定すべきである。属性機器と比較した場合の貴殿の機器のあらゆる側面について、FDAが効率的に審査する際に役立つよう、属性機器と貴殿の機器の類似性及び相違点の概略をまとめた表を添付すべきである。

新しい機器を審査する際の主な論点は、特定の使用目的、試験対象標本の種類、そして利用する技術である。新しい機器を適切に説明できるよう、記述的情報に加え、機器の技術に関連のある、適切な査読審査文献の参照を提示してもよい。

乳癌の予後のための遺伝子発現プロファイリング試験システムについて、適切に特性評価できるよう、以下に挙げる記述的情報を記載すべきである。

使用目的

使用目的においては、試験の測定要素、試験の利用対象となる臨床的適応症、試験において意図する特定の集団を指定すべきである。臨床成績が実証された患者に関する臨床的記述及び人口学的記述も盛り込むべきである（例：性別、年齢、リンパ節の状態、腫瘍の種類、腫瘍のサイズなど）。使用目的においては、試験が定性的か定量的かの区別も指定すべきである。試験が単一の試験所での利用を意図される場合、この情報も使用目的に盛り込むべきである。

試験方法

貴殿の機器で用いる方法論について、詳述すべきである。例えば、以下に挙げる要素について、貴殿の機器に当てはまる範囲で記述すべきである。

- ・ 試験プラットフォーム（例：RT-PCR 又は発現アレイ）。
- ・ アレイ又はその他、空間的に固定されるプラットフォームの構成及び空間配置。
- ・ アッセイ要素、特に正規化に使用される遺伝子、ハイブリダイゼーションの指標、品質管理などのパラメータに関する記述。
 - ・ 試料のキャリアオーバー又は汚染の可能性の評価方法。
 - ・ アッセイの制限因子（例：ハイブリダイゼーションの飽和水準、最大サイクル数）。
 - ・ アレイに関する下記の要素：
 - 固体表面へのプローブ材料の取付方法。
 - ハイブリダイゼーションの条件、洗浄手順及び乾燥条件（例：温度、所要時間）。
 - ・ 重要な配列に対するプローブの特異性、特に偽遺伝子又は配列関連遺伝子が存在する場合の特異性。
 - ・ 腫瘍又は代替標本が抽出されてから試料の処理に至るまでの試料採集及び取扱い方法。
 - ・ 貴殿が実施する又は使用者に提供する、或いは使用を推奨する RNA 抽出方法。
 - ・ 試料抽出物における RNA の完全性を確保するための方法。
 - ・ 提供される又は使用を推奨される試薬の成分及びシステム内での試薬の機能（例：緩衝剤、酵素、蛍光染料、化学発光試薬、その他のシグナル伝達／増幅試薬）。
 - ・ 貴殿の機器に必要な計装（構成要素及びシステム内におけるそれらの機能を含む）
 - ・ 計装により生成される出力の種類及びシステムパラメータ（例：測定範囲）。
 - ・ 生データから最終的な予後結果に至るまでの計算処理過程（例：原初のシグナルが予後シグナルへ変換される形態）。これはデータセットにおける欠落データや明白な問題点の特定及び解決のための十分ソフトウェア制御が含まれることになる。正規化のためのバックグラウンドに対する調整について記述すること。
 - ・ 貴殿が使用者へ推奨又は提供する外部制御。
 - ・ 内部制御及びシステム内での内部制御特有の機能に関する記述。
 - ・ （該当する場合）当該試験方法について記述した、関連のある査読審査文献の参照。
 - ・ 非標準の器具又は方法に関する図解又は写真（用意できる場合）。

貴殿の機器に該当する場合、下記の懸案に対処するために用いられる品質管理設計仕様について記述すべきである。

- ・ アッセイの特徴（プローブ等）の正しい配置及び識別情報。

- ・ 多重試験において標的分子が多数の様々なプローブと接触することになる場合、特異的及び非特異的なプローブの交差ハイブリダイゼーションの可能性。
- ・ 多重試験において多数のプローブが製造工程内で取り扱われる場合、プローブの交差汚染の防止。

試験アルゴリズム

これらの種類の試験機器で乳癌の予後の予測に用いられるアルゴリズムは、多くの場合斬新で独自仕様かつ複雑なもので、また試験機器における最も重要な要素に属することが多いと考えられる。該当する場合、以下を提供すべきである。

- ・ アルゴリズムのアーキテクチャ及び実装に関する詳細な記述。
- ・ 試験で使用するパターン又は分類子の発見及び妥当性確認に使用されたデータセットに関する詳細な記述（多くの場合「訓練」セット、独立的な「試験」セットと称される）。これはデータの源泉となった試料の選定に用いられた原則（臨床経歴、人口統計学、マトリックス、地理的起源など）、試料サイズ、データセットを統合する際に前提とした想定条件を含む。
- ・ 成績尺度（独立的臨床データセットを用いる内部的妥当性確認及び外部的妥当性確認）及びそれらの取得方法に関する詳細な記述。

場合によっては、機器やアルゴリズムが製品開発の進行につれて進化してゆくこともある。提出書類に記載される最終的な機器とその機器用のアルゴリズムを使用して得られたデータを提供すべきである。

試験結果

臨床医向けに生成される試験報告書の見本（例：プリントアウトしたもの）を提供すべきである。試験報告書には、発注者である医師やその他の医療従事者が理解できる適切な情報を記載すべきである。試験報告書の臨床的妥当性確認データセットにおいて、試験成績に言及すべきである（例：「この試験は臨床的母集団を対象に行われ、分析の結果、低リスク患者については5年経過時の無転移生存の確率が92%であることが判明した。高リスク患者については5年経過時の無転移生存の確率が60%であることが判明した」）。試験報告書には他にも、臨床的妥当性確認データセットを使用して算出した、低リスク患者及び高リスク患者に関する Kaplan-Meier 生存曲線等の記述的情報を記載してよい。

6. 性能特性

510(k)において、下記に概要を示す性能特性それぞれの評価に用いた試験設計について詳述すべきである。

分析前因子

分析前因子に関する考察は、質の高い遺伝子検査に不可欠である。

標本採集

試料の採集、輸送及び保管について、貴殿が推奨する選択肢を全て評価すべきである（例：RNA 保存用固定剤、冷凍・固定パラフィン埋め込み腫瘍組織）。試験ラベルで推奨されるものと同じ方法で取り扱われる標本を使用して、試験の妥当性が確認されることを確保すべきである。腫瘍の切除から保存に至るまでの許容経過時間（例：急速冷凍、固化等の方法による処理）が、標本を一様に許容できる結果となることについて、妥当性を確認すべきである。標本の輸送条件を指定すべきである。輸送条件が、試料の完全性を保つ上で、また輸送条件の変動の許容限度（例：輸送所要時間、必要な冷却剤の量）を判定する上で適切であることについても、妥当性を確認すべきである。

適切な保管条件について妥当性を確認する際は、試料及び抽出された RNA 生産物の双方を対象に含めるべきである。

RNA 抽出

試験キットに RNA の抽出及び調製用の試薬を用意する意向の場合、分析前過程の各段階において、試薬が生産物の再現性、正確性及び安定性に及ぼす影響の妥当性を確認し、研究設計及び結果を 510(k)提出書類に記載すべきである。外部施設で研究（例：再現性、方法比較）を行う場合、分析前過程の評価を含めるべきである。

試験キットに RNA の抽出及び調製用の試薬を用意する意向でない場合、的確な試験結果を得られる RNA の十分な質を確保できるよう、適切な仕様を定めるべきである。仕様の例として OD260/OD280 比、リボソーム RNA 比（28S/18S）、RNA の完全性の測定など挙げられる。研究専用試薬（RUO）は一切、推奨すべきでない。

品質管理

この種の遺伝子発現プロファイリング試験システム向けに、様々なレベルの品質管理対策を検討すべきである。管理対策においては、1) 試料／生検の質、2) RNA の質、そして 3) 工程品質、これら 3 項目に関する情報を提供すべきである。工程品質管理対策は、RNA ラベリング、増幅、ハイブリダイゼーション、スキャニング及び正規化を含め、ただしこれらに限らず、工程全体を反映すべきである。

管理対策においては、試料の組成及び RNA 濃度の概要を示すことにより、システムの正当性を適度に疑うほか、カットオフを中心とする再現性への対処も可能とすべきである。

品質管理及び較正に関して、以下の項目について記述すべきである。

- ・ システムに含める、又はシステム向けに推奨する様々な管理対策の性質及び機能。係る管理対策においては、全ての段階及び極めて重要な反応が汚染或いは交差ハイブリダイゼーションを伴うことなく進行したかどうか、使用者が判断できるようにすべきである。
- ・ 値の割当方法（相対値又は絶対値）及び管理対策及び較正材料の妥当性確認（該当する場合）。
- ・ 要求される仕様に計装が適合していない状態の検出に利用可能な管理パラメータ。

分析性能

試作機ではなく最終版の機器を使用して、全ての分析性能研究を実施すべきである。貴殿がアッセイ（例：組織生検、針生検）向けに推奨する RNA の調達源全てに由来するアッセイについて、RNA 抽出も含め、性能を評価すべきである。当方は、下記の性能特性について記述するよう勧告する。

標本要件

貴殿が指定する標本要件が、所定の正確性及び精度基準の範囲内における貴殿の試験の診断パターン又は分類子を特定する上で十分であることについて、妥当性を確認すべきである。以下の項目を判定すべきである。

- ・ 許容可能なアッセイを貴殿の機器で実施するために必要な組織量の最低基準。
- ・ 許容可能な結果を出すために必要な、標本中の腫瘍細胞の割合の最低基準（例：ヘマトキシリン・エオジン（H&E）染色による判定）。
- ・ 許容可能な壊死組織又は出血性組織の割合の最低基準（該当する場合）。
- ・ アッセイにおいて、機器が一定の正確性及び精度基準を満たす信頼性のある結果を出すことのできる、

RNA/cRNA 濃度及び腫瘍標本量の下限及び上限。

複雑なアルゴリズムを用いてシグネチャー（パターン又は分類子又は指標）を生成するアッセイの場合、RNA 濃度及び／又は腫瘍細胞の割合が、精度尺度で示されるアッセイ結果の信頼性を落とすことがないように配慮すべきである。

分析上の特異性／干渉

該当する場合、貴殿の機器における非特異増幅、非特異的ハイブリダイゼーション及び交差ハイブリダイゼーションの可能性を評価すべきである。

潜在的干渉物質が、標本中に存在する（例：脂肪細胞、血液）、或いは標本の採集時（例：人工物の破片など環境的影響）及び試料の調製時に混入するおそれがある。従って、貴殿の仕様は、干渉するおそれのある物質による影響の存在を一切排除できるよう、適切なものであるべきである。

カットオフ

提出書類において、カットオフをどのように判定したか、またこのカットオフ値の妥当性がどのように確認されたかについて、説明すべきである。カットオフは、貴殿の分類子策定方針に適する統計手法を用いて確立されるべきである。アッセイに曖昧な領域がある場合、その曖昧な領域の限度をどのように判定したか、説明すべきである。確立されたカットオフ（及び該当する場合は曖昧な領域）を用いる貴殿の機器の性能について、貴殿の機器に関して定義された使用目的に合致する独立的母集団を対象に、妥当性を確認すべきである。

精度（反復性／再現性）

貴殿の機器の精度（即ち反復性／再現性）を実証するデータを提供すべきである。CLSI（臨床検査標準化協会）の文書、「臨床用化学機器の精度性能評価」（CLSI ガイドライン EP5-A）及び「定性的試験性能の評価のための使用者手順書」（CLSI ガイドライン EP12-A）に、性能に関する主張を立証するための実験設計、計算処理及び形式の策定に役立つと考えられるガイドラインが記載されている。理想的には、精度研究においてアッセ

イの変動性の原因となる要素を全て特定すべきである。報告可能な個々の分類子の全範囲にわたる（例：高リスク、低リスク、境界域）個々の分類子について、性能特性を立証すべきである。精度に影響を及ぼす付加的因子として貴殿が考慮すべき事項の例として、以下が挙げられる。

- ・ 再現性試験に使用する試料が、貴殿が試験ラベリングで推奨するよう計画している手順に従って、臨床標本（例：組織生検）を原料として試験現場にて加工されることを確保すること。
- ・ アッセイが複数の試験所で実施されることを意図する場合、3箇所以上の試験所を対象に含め、各試験所に複数の作業者が所在すること。作業者は、アッセイの潜在的使用者を教育及び経験の面で反映する人物であるべきである。試験システムの市販後に貴殿が使用者の訓練を意図している範囲と同じ範囲に限り、訓練を実施すべきである。
- ・ アッセイが単一の試験所実施されることを意図する場合、当該試験所に複数の作業者が所在すること。
- ・ 複数の製品ロット（例：複数ロットの試薬、複数ロットのプライマー及びプローブ（RT-PCR用）、複数ロットのアレイ）、及び複数の器具を対象に含めること。
- ・ 試験で検出可能な全ての区分（例：高リスク、低リスク、境界域）を代表する、適切な試験試料を使用すること。
- ・ 該当する場合、染料取り込みの際にバイアスが生じないことを確保するため、染料逆転実験を行うこと。
- ・ 該当する場合、試料ラベリング手順の再現性を実証すること。

510(k)における研究設計に関する記述の中で、評価中にどの要因（例：計装の較正、試薬のロット、作業員）が一定に保たれたか、またどの要因が変動したか特定すると共に、データの評価に用いられた計算処理及び統計分析について記述すべきである。

安定性研究

試薬及び器具の実時間安定性を判定するための研究設計、また該当する場合は加速安定性及びストレス試験の条件及び結果について記述すべきである。各研究について、許容基準値の選定方法を記述すべきである。

計装の妥当性確認

複数のシグナルを測定し選別する計装及びシステム、並びに他の複雑な試験所用計装のうち、まだ認可を受けていないものについて、ガイダンス文書「クラス II 特別規制ガイダンス文書：臨床多重検査システム用計装」³を参照して、計装の認可を裏付けるために提供すべきデータの種類に関する詳細を確認すること。

臨床的妥当性確認

臨床研究を基に、貴殿の機器の用途及び主張に対する適応を裏付けるデータを提供すべきである。臨床的妥当性確認研究においては、意図される使用対象母集団に属し、かつ貴殿がシグネチャー（パターン又は分類子又は指標）の策定に使用した標本と無関係な患者試料を使用すべきである。個々及び臨床研究に関するプロトコール（包含基準及び除外基準、研究のエンドポイント、許容基準を含む）と、提案される使用目的をその研究がどのように裏付けるかについて記述すべきである。臨床的妥当性研究に基づく処理後のデータ（即ち予後の結果）と併せて、生データも提出すべきである。

臨床的妥当性確認研究の場合、妥当性確認データセットは、地理的所在地の異なる3箇所以上の臨床現場から集めた臨床試料で構成されるべきである。なるべく、研究は米国国民を対象とする範囲内で実施されることが望ましい。研究を米国外で実施する場合、米国の臨床慣行や人口動態と貴殿の研究の関連性を実証する文書の作成が必要となる。

貴殿特有の機器の臨床的妥当性及び有用性が、既に確立された科学的枠組みや十分な規模の証拠により裏付けられる場合、貴殿の主張を裏付ける査読審査文献の参照を提出してもよい。これらの資料には、適切な母集団を試験対象とする複数の研究を含めるべきである。貴殿の機器の使用に対する適応を、これらの文献で十分に裏付けられない場合、貴殿の機器に関する主張を裏付ける研究を実施すべきである。前向き研究で集められ保管されている試料に関する遡及的分析は、一連の研究におけるバイアスを特定し、全て排除又は軽減するための適切な措置が講じられるなら、許容可能となり得る。当方は、貴殿特有の研究案が適切であるか否か、FDAと協議して判断するよう勧告する。

臨床的転帰との比較を用いての正確性

臨床的真実：貴殿の機器の性能をFDAが判断できるよう、臨床的妥当性確認研究において全ての患者に用いられる臨床的転帰の尺度、並びにその尺度を取得した方法を明確にすべきである。

エンドポイント：貴殿の機器について、適切な予後のエンドポイントを記述すべきである。例として1)手術から遠隔転移までの期間、2)総体的な生存（手術から何らかの原因での死亡に至るまでの期間と定義される）、3)無病生存（手術から再発（局所）、第2の原発性乳癌、遠隔転移、若しくは何らかの原因での死亡に至るまでの期間と定義される）、などが挙げられる。例えば、カプラン・マイヤーの積極限推定量は、これらのエンドポイントのうち1つ又は複数について、time-to-event（事象が発生するまでの経過期間）曲線の表示に利用できる。一定の時間間隔における95%両側信頼区間を含められる場合もあるが、使用対象母集団によって実際の時間が異なってくる可能性がある（例：5年経過時の事象が関連性を持つ患者群もあれば、そうでない患者群も存在する）。或いは、モデル想定条件に適合すれば、連続値リスク記述子（例：ハザード比）を利用できる場合もある。

妥当性確認方針：遺伝子シグネチャーの妥当性確認に用いられる方法を提示すべきである。この方法は、臨床プロトコール及び統計分析プランを含むべきである。臨床データは、遺伝子シグネチャーの開発に用いられたものではなく、新規のデータセットとすべきで、また患者は当該機器の使用対象母集団を代表する患者であるべきである。統計的アプローチについて、「ハザード比」の推定（time-to-eventデータに関する統計手法を用いて計算を行う推定）を利用して、ある事象の相対リスクを高リスク集団と低リスク集団を比較して定量化することが候補に挙げられる。妥当性確認向けの統計分析プランには、臨床研究において関心の的となる相対リスクに関する仮説を含めるべきで、例えば5年以内に転移癌が発達するリスクは、遺伝子発現プロファイル x により推定可能である。仮説上の相対リスクは、予後マーカーとしての遺伝子シグネチャーの妥当性を立証する、臨床的に関連性のある差異であるべきである。

臨床研究は、この仮説を実証するに足る十分な統計的検出力を得られる規模で実施すべきである。注意点として、経時的研究においては一部の患者が調査を打ち切られることになり、例えばある女性が研究終了前に心臓疾患など乳癌と無関係な原因で死亡する場合がそうであるが、当方としては、そのような事例も全て分析に含めることを期待したいところである。多数の統計手法が、貴殿が 510(k) の提出に先立って確認すべき想定条件に依拠するものである（例：コックス回帰モデルにおける比例ハザード）。研究の範囲内での患者に関する記述的統計はもとより、特定の患者群に関する生存曲線、或いは貴殿のエンドポイントに関連するリスクの推定値（例：5 年以内に転移性疾患を発症する患者の割合の推定値も含め、この臨床的妥当性確認研究の概要を提示すべきである。

予後成績は、転移性疾患の確率又はリスクに関して、以下の通り測定可能である。

- (1) P（機器の転帰が「転移性疾患のリスクは低い」とされる前提で 5 年以内に転移性疾患の発症なし）
- (2) P（機器の転帰が「転移性疾患のリスクは高い」とされる前提で 5 年以内に転移性疾患の発症あり）

注意点として、(1) は陰性予測値の定義と一致し、(2) は陽性予測値の定義と一致する。当方は貴殿に対し、それぞれについて 95% 信頼区間を報告するよう求める。成績は、中軸的研究における「5 年以内における転移性疾患」の有病率の影響を受けることになる。従って、研究対象コホートにおける目標エンドポイントの有病率を報告すべきである。

貴殿の機器に関する結果を用いた一次分析に加え、貴殿の機器が「付加価値を持つ」ものであり、また医師へ提供可能な臨床データを検討した後であってもなお、予後に関する追加情報を提供するものであることを実証する分析結果も提示すべきである。乳癌の場合、様々な情報源から予後値に関する情報がもたらされる（例えば患者の年齢、ER 状態、腫瘍のサイズ及び等級は定期的に評価される）。付加的な予後値を現在の臨床慣行で得られる定常的情報と比較したものを実証する情報を、提供すべきである。コックス回帰モデルが検討対象となり得る。

検討対象として適切な情報は、関心の的となる研究対象集団の如何によって変動し得る。当方は、研究の実施に先立ち、貴殿特有の研究案について FDA と協議するよう勧告する。

研究試料

前向き試料が好まれる一方、備蓄分からの十分に特性評価された試料を臨床的妥当性確認研究に利用してもよいが、採集又は選定のバイアスが一切なく、かつ患者の経歴及び適切な転帰情報を入手可能であることが条件である。選定（包含／除外）基準について全面的に記述し、また試料に関連する特徴又は制限を特性評価すべきである（前向き試料か備蓄分からの試料かのいずれを問わない）。患者の人口学的データや疾患の特徴、並びに使用目的及び研究対象母集団において関連のある転帰の有病率について記述すべきである。試料の選定は、試料の完全性、保管期間及び腫瘍サイズなどバイアスの発生源を最小限に抑えられる方法で行うべきである。当方は貴殿に対し、備蓄試料を使用して中軸的研究を実施する前に、FDA に相談するよう勧告する。

臨床材料からの確な結果を得られることを実証するため、使用目的において貴殿が主張する全てのマトリックス（例：冷凍又はホルマリン固定、パラフィン埋め込み（FFPE）、或いは核酸保存料内に採集されたもの）に由来する臨床試料を使用すべきである。適切な試料サイズは、精度／再現性、界面及びその他、試験の性能特性等

の要因に左右される。当方は、貴殿の研究試料サイズの裏付けとなる統計手法を用いて、正当化自由を提示するよう勧告する。貴殿が臨床研究で使用する試料について、遡及的に検証された試料の保管及び輸送がアッセイ結果に影響を及ぼしていないことを実証するデータを提供すべきである。

試料の採集及び輸送の条件

時間及び温度の推奨条件の下で保管／輸送され、指定された回数の冷凍／融解（該当する場合）処理を施された標本アリコートの分析結果を用いて、推奨される保管期間及び温度が試料の安定性及び回復に及ぼす影響を評価すべきである。こうした類の研究の場合、試料の安定性パラメータ全てに対する許容基準を明記すべきである。

7. ソフトウェア

貴殿のシステムにソフトウェアが含まれる場合、懸念度に応じて詳細に記されたソフトウェア添付資料を提出すべきである（「医療機器に含まれるソフトウェアの市販前提出書類の内容に関するガイダンス」⁶参照）。危険の軽減より先に、懸念度を判断すべきである。この種の体外診断用機器は中程度の懸念度と見なされ、それはソフトウェアの不具合が患者に間接的に影響を及ぼす可能性があることや、医療提供者や患者が正確な情報を得られないことが原因で負傷を招く結果となるおそれがあるためである。

FDA の審査用にソフトウェア添付資料を準備する場合、適宜、以下の点を考慮に入れるべきである。

- ・ ソフトウェアの設計に関する十分な記述。使用目的の範囲を超えた用途を特に支援するような設計のユーティリティを含めるべきではない。また、設計においてはプライバシーとセキュリティの問題を考慮すべきである。こうした課題の一部について、医療保険の相互運用性および説明責任に関する法律（HIPAA）に関するウェブサイト、<http://aspe.os.dhhs.gov/admnsimp> で情報を得られる場合がある。
- ・ 機器の設計、並びに信号の検出及び分析、データ保存、誤った患者報告に関連するシステム通信及びサイバーセキュリティ、計装の不具合、操作者の安全といった、サブシステム・コンポーネントの不具合による影響に関する、批判的思考に基づく危険分析。
- ・ 実質的同等性の実証を目的に提出される、当該バージョンのソフトウェアに関する完全な検証と妥当性確認に（V & V）の文書化。また、アッセイソフトウェアと計装用ソフトウェアの互換性の妥当性確認に関する情報も提供すべきである。
- ・ 510(k)の記載情報が、リリースバージョン以外のバージョンに基づいている場合、相違点を全て特定し、こうした相違点（未解決の異常も含め）が機器の安全性や実効性にどう影響するかについて詳述すること。

以下に挙げるのは、FDA の規制に沿った優良なソフトウェアのライフサイクル慣行の下で、機器の開発および維持の一助となる、付加的な参考資料である。

- ・ ソフトウェア妥当性確認の一般原則、産業界及び FDA 職員向け最終ガイダンス。FDA のウェブサイト、<http://www.fda.gov/cdrh/ode/510kmod.pdf> より入手可能。

- ・ 医療機器における既製ソフトウェア利用ガイダンス（最終版）。FDA のウェブサイト、
<http://www.fda.gov/cdrh/ode/guidance/585.pdf> より入手可能。
- ・ 21 CFR 820.30 Subpart C - 品質システム規制に対する設計管理。
- ・ ISO 14971-1、医療機器 - リスク管理 - 第 1 部：リスク分析の適用。
- ・ AAMI SW68:2001、医療機器ソフトウェア - ソフトウェアのライフサイクルプロセス。

8. ラベリング

市販前届出には、21 CFR 807.87(e)の要件を満たす、十分に詳細な内容のラベリングが含まれるべきである。最終的なラベリングが 510(k)の認可に必要なわけではないが、体外診断機器向けの最終ラベリングは、体外診断機器が州間取引に導入される前に、21 CFR 809.10 の要件に準拠しなければならない。下記の勧告は、これらの要件を満たすラベリングの作成の支援とすることが狙いである。

単一の試験所で実施されることを意図され、パッケージ化される機器の一要素として添付資料を配布しない試験システムの場合、製造者は、一般にアクセス可能な FDA の 510(k)データベースウェブサイト (<http://www.accessdata.fda.gov>) に掲載された 510(k)の要約及び／又は決定要約文書への参照リンクを試験報告書様式に記載することにより、使用者がラベリング情報を入手できるよう対応すべきである。

使用目的

使用目的においては、試験の測定要素、試験の利用対象となる臨床的適応症、試験において意図する特定の集団を指定すべきである。臨床成績が実証された患者に関する臨床的記述及び人口学的記述も盛り込むべきである（例：性別、年齢、リンパ節の状態、腫瘍の種類、腫瘍のサイズなど）。使用目的においては、試験が定性的か定量的かの区別も指定すべきである。試験が単一の試験所での利用を意図される場合、この情報も使用目的に盛り込むべきである。

機器に関する記述

貴殿の機器で用いられる試験方法について記述すべきである。

全般的手順

医師による試料採取から結果の報告に至るまで、分析手順に関する全般的記述を盛り込むべきである。

使用上の指示事項

貴殿の機器の技術的特徴や機器の使用方法を正確に説明する、明瞭かつ簡潔な取扱説明書を提供すべきである。取扱説明書は、機器の特徴や安全かつ効果的な機器の使用方法について、使用者が積極的に精通することを奨励する内容であるべきである。

取扱い及び保管の条件に関する指示も記載すべきである。また貴殿が使用者に推奨する、開放状態及び閉鎖状態での保管条件下における安定性についても記述すべきである（即ち有効期限の日付表記）。

品質管理

品質管理上の勧告を、添付資料に記載すべきである。これはアッセイに用いられるべき管理対策の内容や、管理材料について予測される結果に関する明瞭な説明も含むべきである。

注意、警告及び制限

アッセイの制限をラベルに明記すべきである。この部分には、医師が試験を指示する前に知っておく必要がある適切な制限及び警告が含まれるべきである。

貴殿のアッセイに関連する制限や警告に加え、乳癌の予後のための遺伝子発現プロファイリング試験システムには、以下に挙げる制限が盛り込まれるべきである。

- ・ このアッセイの結果を診断に利用すべきではない。
- ・ このアッセイの結果を、治療法に対する応答の予測、或いは最適な治療法の選定に利用すべきではない。
- ・ このアッセイの結果を、治療法の除外に利用すべきではない。
- ・ 結果は研究対象とされた患者サンプルの集団に限定される旨を説明する記述、例えば「本研究では術後の補助治療を受けなかった女性を母集団とする備蓄サンプルのみ使用した」、或いは「本研究の対象助成は特定の母集団を代表するに過ぎない」といった記述。

性能特性

添付資料において、第6節に記載の研究設計や研究結果について、使用者が試験結果を解釈する際に役立つと思われる要約を記載すべきである。このセクションには、臨床的（即ち医学的）及び分析的（即ち技術的）性能特性に関する記述を盛り込むべきである。臨床的性能特性には、臨床的研究妥当性確認の要約を盛り込むべきである。分析的性能特性には、研究の結果と用いられた方法論に関する記述を盛り込むべきである。

結果の解釈

患者特有の結果を伝えるために使われる「分類」、「パターン」、「スコア」、或いは「指数」を明瞭に定義すべきである。報告書で引用される予後エンドポイント（遠隔転移が生じるまでの期間、或いは総体的な生存及び無病生存など）は、機器の臨床的妥当性確認に用いられた臨床試験の結果を基本とすべきである。

期待値

このセクションには、試験の期待値及び結果の説明を盛り込むべきである（例：「高リスクとは基準群に属する患者の x%が5年以内に遠隔転移を生じたことを意味する」、「再発スコア7とは、（中略）を意味する」）。また、期待値の判定に用いられた母集団のサンプルの数、年齢、性別、人口学的データも記載すべきである。

¹Sargent DJ, Conley BA, Allegra C, Collette L. Clinical trial designs for predictive marker validation in cancer treatment trials. J Clin Oncol. 2005;23(9):2020 – 2027.

² “Class II Special Controls Guidance Document: Instrumentation for Clinical Multiplex Test Systems”

³ “Class II Special Controls Guidance Document: Instrumentation for Clinical Multiplex Test Systems”

⁴Five years is used in this section, as an example of a minimum time point. It is possible that some studies may have endpoints exceeding five years.

⁵ The use of banked leftover specimens is discussed in FDA's guidance "Guidance on Informed Consent for In Vitro Diagnostic Device Studies Using Leftover Human Specimens that are Not Individually Identifiable."

⁶"Guidance for the Content of Premarket Submissions for Software Contained in Medical Devices".

3.4.2 米国 FDA によるガイダンスの例 2（翻訳文）

第 2 回開発ワーキンググループ委員会の資料（平成 24 年 1 月 12 日）として、FDA が公表した以下のクラス II 特別規制ガイダンス文書を翻訳して配付した。

「産業向けガイダンス：薬理ゲノミクス・データ提出要項－」“DRAFT GUIDANCE: Pharmacogenomic Data Submissions”（August 24, 2007）

産業向けガイダンス：薬理ゲノミクス・データ提出要項－附属ガイダンス
ガイダンス草案

本ガイダンス文書は、コメントを求めることのみ目的とする。

この草案文書について意見や提言があれば、ガイダンス草案の配布を発表する旨の Federal Register（連邦公報）の公表後 90 日以内に提出のこと。意見書の提出先は Division of Dockets Management (HFA-305), Food and Drug Administration（食品医薬品局案件管理部）（所在地：5630 Fishers Lane, rm. 1061, Rockville, MD 20852）である。意見書は全て、連邦公報にて公表の、配布に関する通知に記載の案件番号を添えて特定のこと。

この草案文書に関する質問の問い合わせ担当者は Federico Goodsaid（CDER、電話 301-796-1535 又は Raj Puri（CBER、電話 301-827-0471））。

米国保健社会福祉省

食品医薬品局

医薬品評価研究センター（CDER）

国立毒物学研究所（NCTR）

生物製剤評価研究センター（CBER）

医療機器放射線衛生センター（CDRH）

2007 年 8 月

手順書

産業向けガイダンス：薬理ゲノミクス・データ提出要項－附属ガイダンス

複本は以下より入手可能：

食品医薬品局 医薬品評価研究センター 医薬品情報部、HFD-240 訓練・通信事務局

5600 Fishers Lane Rockville, MD 20857

(電話) 301-827-4573

<http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>

及び／又は

食品医薬品局 生物製剤評価研究センター 通信・訓練・製造業者支援事務局

1401 Rockville Pike, Rockville, MD 20852-1448

<http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>.

(電話) 800-835-4709 or 301-827-1800

及び／又は

食品医薬品局 医療機器放射線衛生センター 小規模製造業者・国際・消費者支援部 (HFZ-220) 通信・教育・放射線プログラム事務局

1350 Piccard Drive Rockville, MD 20850-4307 U.S.A.

<http://www.fda.gov/cdrh/ggpmain.html>

電子メール: dsma@cdrh.fda.gov

Fax: 301.443.8818

(電話) 製造業者支援担当: 800.638.2041 又は 301.443.6597

(電話) 国際担当職員: 301.827.3993

目次

I. 序文

II. マイクロアレイからの遺伝子発現データ

A. RNA の分離、取扱い及び特性評価

1. RNA 分離前の検討事項

2. 組織又は細胞からの RNA 分離

3. 全血及び PBMC からの RNA 分離

4. RNA の保管

5. RNA の QC (品質管理)

B. ラベリング反応

C. マイクロアレイ向けのハイブリダイゼーション

D. マイクロアレイ用蛍光リーダー設定

E. 差次的発現遺伝子

F. 差次的発現遺伝子リストの生物学的解釈

III. 遺伝子型判定

A. 遺伝子型判定方法

B. DNA の分離、取扱い及び特性評価

C. 遺伝子型判定報告

IV. 習熟度試験

V. 臨床研究報告書におけるゲノミクス・データ

VI. 非臨床毒物学研究からのゲノミクス・データ

A. 選定過程基準の拡大

B. 特定の化合物の特性評価

C. 全般的な科学的論考

VII. データ提出形式

A. 提出標準

B. マイクロアレイ遺伝子発現データ

C. 臨床データ及び非臨床データ

附属書 I：実験結果要約表（EXPSUMTABLE）

附属書 II：非臨床研究データ提出見本

産業向けガイダンス¹

薬理ゲノミクス・データ提出要項-附属ガイダンス

本ガイダンス草案は、最終承認されれば、このテーマに関する食品医薬品局（FDA）の現在の考えを示すものとなる。これは何人のための権利或いは何人に対する権利をも創出又は付与するものではなく、また FDA 或いは一般市民に義務を負わせる働きを有するものでもない。別のアプローチが、適用される法律や規制の要件を満たすものであれば、それを利用してもよい。代替アプローチについて議論を望む場合、本ガイダンスの履行に責任を負う FDA 職員に連絡のこと。適切な FDA 職員を特定できない場合、本ガイダンスの表紙に記載の電話番号へ問い合わせのこと。

I. 序文

本ガイダンスの意図は、「薬理ゲノミクス・データ提出要項」ガイダンス（2005 年 3 月）の附属文書として使用されることにある。本書は同ガイダンスの発行以来、自主的なゲノミクス・データの提出に加え、治験薬（IND）承認申請、新薬承認申請（NDA）、生物学的製剤承認申請（BLA）の下で提出された多数のプロトコルやデータに関する FDA による再検討に伴って培われた経験を反映している。本書に記載の勧告の意図は、薬理ゲノミクス分野の科学的進歩の推進、並びに医薬品開発における薬理ゲノミクス・データの活用推進にある。FDA は、この附属ガイダンスに記載の勧告が、2005 年 3 月に出された勧告と併せて、ゲノミクス・データの自主的提出、或いはゲノミクス・データを含む提出資料のマーケティングを検討しているスポンサーにとって役立つと考えている。技術の変化や経験の蓄積につれ、これらの勧告は更新される場合がある。

FDA のガイダンスは、本ガイダンスも含め、法的強制力のある責務を定めるものではない。むしろ、これらのガイダンスはある主題に関する FDA の現在の考えを記述するもので、特定の規制上又は法律上の要件を引用している場合を除き、単に勧告と見なすべきである。FDA のガイダンスにおける should（～すべきである）という言葉の使用は、何らかの提言又は勧告であって、要求事項ではないことを意味する。

II. マイクロアレイからの遺伝子発現データ

下記の方法論的課題について、マイクロアレイからの遺伝子発現データ提出時に検討すべきである。本書に記載の勧告は、IND、NDA 及び BLA の裏付けとして提出され得るマイクロアレイ・データの開発に当てはまる。診断機器の認可又は承認の裏付けとなるマイクロアレイ・データについては、係る勧告の適用範囲を超えて追加情報の提供が求められる場合がある。

A. RNA の分離、取扱い及び特性評価

マイクロアレイ遺伝子発現実験など、RNA ベースの実験実施に際し最も重要な段階の 1 つに、高品質かつ無傷の RNA の分離がある。この目標を達成し、実験過程全体を通じた試料の完全性を保持するため、RNA 精製の前後におけるいくつかの段階を入念に計画することにより、分離作業中の品質を確保し、下流の用途で使用する前の高品質を確認すべきである。次なる目標は、RNA 収率の最大化である。加えて、試料の保管条件や輸送条件が RNA の安定性に影響を与える可能性もある。従って、試料の完全性を保持できるよう、RNA を最良の条件下で保管することが非常に重要である。最後に、当局は、RNA 分離方法及び RNA 品質の再現性を確保できるよう、標準作業手順（SOP）を確立するよう勧める（例として以下参照：

http://www.fda.gov/nctr/science/centers/toxicoinformatics/maqc/docs/MAQC_Sample_Processing_Overview_SOP.pdf）。

下記の勧告は、これらの目標達成に役立つであろう。

1. RNA 分離前の検討事項

RNA は RNase による劣化に対し敏感で、RNase は生きた有機体に普遍的に存在する。従って、試料の取扱いに関する課題に対処すべきであり、また試料取扱い方法についても、係る方法や関連する測定基準が、試料からの RNA 分離開始に先立ち目的に適っていることを確保できるよう、評価する必要がある。当局はさらに、提出研究用データの生成に使用される作業区域及び機器が全て、RNA 分離及び他の RNA 関連作業専用とされることを勧める。

RNase 非含有試薬及び使い捨て品／ガラス製品：RNase 非含有試薬及びガラス製品を、RNA 分離使用することが不可欠である。市販の RNA 分離キットは、これらを提供するものが多い。提出研究の開始に先立ち、RNase 不活性化方法が期待通りに機能するかどうか確かめておくことが有用と考えられる。

RNA 安定剤：当局は、試料／試薬へ RNA 安定剤を添加する必要性の評価、適切な RNA 安定剤の特定及びその適切性の評価を、予備実験にて行うことを勧める。

バッチサイズ：当局は、試料調製における最大バッチサイズを、RNA 分離工程全体の所要時間の特定及び制限に役立てよう、判断することを勧める。処理時間が長くなると RNA の完全性を損ねてしまうおそれがあるため、バッチサイズの上限を定めておけば、増幅工程で遭遇する問題の低減に繋がる。

試料の採取、保管及び輸送の条件：マイクロアレイ研究における試料の再現性に影響を及ぼし得る変数が多数ある。当局は、RNA の品質に対する下記の変数の影響の評価を勧める。係る変数には以下が含まれる。

- ・ 試料の最大／最小寸法
- ・ 容積
- ・ 重量

他に重要なパラメータとして以下が挙げられる。

- ・ 組織／器官別の適正な試料採取技法
- ・ 試料解離のタイミング／処理時間
- ・ 組織の切除から安定化に至るまでの最大許容経過時間
- ・ 推奨条件下（温度、輸送時間等）にて輸送中の標本の安定性

他にも検討を要する、研究特有のパラメータが存在する場合がある。例えば腫瘍学研究の場合、当局は試料中の腫瘍含有率の判定を勧める。

2. 組織又は細胞からの RNA 分離

RNA 分離前の細胞試料又は組織試料の処理、及び入念な取扱いが、RNA の保全に必要である。高品質の RNA を上手く分離させるために利用可能な方法がいくつかある。また、RNA の本質保持に役立つ試薬も、多数用意されている。例えば、RNA 分離手順に適合する RNA 安定剤を、分離した組織又は細胞に加えてから、試料を保管するとよい。或いは、組織又は細胞を液体窒素中で素早く凍結させ、-80℃ で保管すると、RNA の劣化を防ぐことができる。また組織又は細胞を、RNase を不活性化する強力な変性剤の存在下で均質化し、続いてホモジネートを-20℃ 以下で凍結させるという方法もある。いずれの場合も当局は、製造業者の仕様に従うこと、並びに結果的な RNA の品質が研究に対し許容可能な水準となることを勧める。RNase 非含有試薬、機器、材料及び作業空間を、後続の分離作業及び分析作業に使用すべきである。

3. 全血及び PBMC からの RNA 分離

RNA は全血から、或いは末梢血単核細胞（PBMC）から分離可能である。これまで行われてきた研究のほとんどで PBMC を使用しているが、それは血液中でも最も転写活性化された細胞だからである。² この画分の主成分はリンパ球と単球である。PBMC や全血から分離した RNA を、同一研究で相互に代用すべきではない。

全血からの RNA 分離：RNA は全血から分離可能で、この種の標本は魅力的であるが、それは血液試料に RNA 安定剤を添加すれば、製造業者推奨条件下だとおそらく RNA の品質或いは発現プロファイル安定性を損なうことなく長期保管可能となるからである。選定された全血試料の保管に用いる保管条件及び最長保管期間は、選定されたプラットフォームに適用可能な如何なる許容基準も満たすべきである。全血からの RNA 分離には 1 つ不利な点があり、それは標本中の網状赤血球（未成熟赤血球（RBC））が RBC のわずか 0.5～2% 相当に過ぎない

一方、全 RNA における mRNA の質量に占める割合が最大 70%に達し、その中でグロビン mRNA が主要な RNA であるということである。マイクロアレイ遺伝子発現実験において、グロビン mRNA の過剰は、少量しかない一部の転写の検出に失敗するという結果を招く可能性がある。³ 全血標本で作業する傍ら、全血からのグロビン mRNA を減らすプロトコル⁴、或いは別の、遺伝子発現データに対するグロビン mRNA の影響を最小限に抑える方法を検討すべきである。そうした方法が必要と判断される場合、それが自分の方法を背景に意図される通り機能することを確保しなければならない。

全血標本から生成されるマイクロアレイ・データの質は、網状赤血球の除去によって向上可能であるが、これは大抵、採血場所での血液処理を必要とする。血液試料の操作は、一部の転写における遺伝子発現プロファイルに変化を生じさせるおそれがある。⁵ 従って当局は、採用予定の臨床前又は臨床での血液標本の採取及び操作の条件を模擬化する研究を実施すること、及び選択された方法に対して主要な変数が及ぼす影響を評価することを勧める。

PBMC からの RNA 分離：RNA は、様々な技法のうち 1 つを用いて全血標本から分離済みの PBMC から分離可能である。よく用いられる方法の例として Ficoll-Hypaque 遠心分離や、クエン酸ナトリウム入り採血管の使用が挙げられる。PBMC からの RNA 分離は多くの用途に好ましい方法で、それは RNA にグロビン mRNA が含まれず、また概してマイクロアレイに関して比較的良好な結果を得られるからである。ただし、時間遅延や温度変化が、いくつかの遺伝子の発現プロファイルに影響を及ぼす可能性があることが示されており^{6,7}、従って採血から数時間以内に PBMC を分離することが極めて重要で、発現プロファイルを安定させるための安定化材料又は保管条件を用いない場合は特にそうである。どの方法を選ぶかに関わりなく、品質パラメータの測定を通じて、選定された分析方法に対し許容可能な性能パラメータに応じて RNA 収率に一貫性と確実性があることを保証すべきである。複数の RNA 分離方法を選ぶ（例：別々の製造業者 2 者からの方法）場合、自分のシステムでどちらの方法でも同等の結果が得られることを確かめるべきである。

4. RNA の保管

短期保管の場合、RNase 非含有水（0.1 mM の EDTA 含有）又は TE 緩衝液中に懸濁させた RNA を、複数のアリコートに分けて -80°C で非着霜防止型冷凍庫に保管すべきである。凍結融解の繰り返しを避けるべきである。概して、上記の条件下であれば RNA は -80°C で約 1 年間、安定した状態である。長期保管の場合、RNA 試料をエタノールに浸し、-20°C で保管するとよい。

5. RNA の QC（品質管理）

RNA 試料の品質は、様々な形態で監視可能である。最も幅広く用いられている最新の測定基準は、260nm/280nm の吸光度比を RNA の品質及び純度の尺度として用いる分光光度分析である。⁸ さらに 2 つ、よく用いられる方法が、アガロースゲル電気泳動法と、専用 RNA 分析機器での分析である。RNA 品質測定基準に関する検討事項には以下が含まれる。

・分光光度分析の場合、260nm 及び 280 nm (A260/A280) の分光度比を RNA 純度評価に利用でき、これは典型的に 1.8 より大きい値が推奨される。⁹

・アガロースゲル分析の場合、概して 1%の変性アガロースゲルが使用され、はっきり視認可能な 18S 及び 28S の RNA 帯域が RNA 完全性の尺度とされる。理想的には、28S 帯域の強度が 18S 帯域強度の 2 倍となるべきである。RNA が劣化すると概観が汚れ、2 つの明瞭な帯域が失われる。

・専用 RNA 分析機器の場合、いくつかの異なる測定基準が有用と考えられ、例えば 18S と 28S の rRNA ピークの存在、28S/18S の帯域比率、rRNA ピークが全 RNA に占める割合などが挙げられる。⁸ 専用 RNA 分析機器に関する具体的な勧告、並びにそれらが生成するデータについては、製造業者の資料を参照のこと。¹⁰

どの方法を選んで RNA の品質を評価するかに関わりなく、RNA 資料の許容基準が、詮索された分析方法に適する RNA 品質を得る上で一貫して適切であることを確かめるべきである。選択された RNA 分離方法は、分離された RNA のゲノム汚染を最小限に抑えられるものであるべきで、それはゲノム DNA が下流の用途に悪影響を及ぼすおそれがあるからである。

B. ラベリング反応

ゲノミクス資料提出に際し、製造業者提供のアレイ上で良好に機能することを実証済みのラベリングシステムをスポンサーが使用することが重要である。極めて重要な点として、スポンサーはラベリング効率に影響を及ぼす、或いはラベリング・バイアスをもたらすおそれのある汚染物質を含有しない高品質の RNA を使用してラベリング・プロセスを開始することが極めて重要で、それは RNA 品質が損なわれると試料処理の後続段階に影響を及ぼし、最終的にマイクロアレイ・データの質がさらに低下する事態となるからである。当局は、容認された品質尺度（18S/28S の比率）の使用がこの報告書に記載されること、並びにラベリング向けに調製された RNA 試料が相応の品質であることを勧める。

当局は、標的ラベリング方法が特定の研究又は 1 つのグループとして分析の全体を通じて一貫して用いられることを勧めるが、それは製造業者の異なるキット、或いは種類の異なるラベリング・キットを使用すると、類似性を欠くマイクロアレイ・データが取得されるおそれがあるからである。ラベリング・キットの重要要素（キットの製造業者、主要な酵素又は試薬）に何らかの変更が生じた場合、当局は、生成されたデータの使用に先立ち、研究の一部として分析される試料とそのデータの比較可能性を実証できるよう検証を行うことを勧める。当局は、試薬ロット許容基準を定めてラベリング反応の再現性を確保することを勧める。

標準作業手順（SOP）の適用が奨励されており、また当局は、作業者が当該研究について試料の処理に先立ち全てのプロトコルに関する訓練を十分に受けることを勧める。機器は適切なスケジュールに従って保守が施され、また試験所環境が製造業者の推奨に従って維持されるべきである。

QC 又は中間のラベリング段階の策定が大いに勧められる。中間の QC 段階で問題が示唆され、RNA が適度な品質の状態であれば、ラベリング工程を反復して、マイクロアレイ・チップへのハイブリダイゼーション向けによ

り上質のインプット材料を生み出すことができる。加えて、試薬を適切な条件下で保管することも勧められる。ラベリング手順全体を通じて一貫した性能を検証できるよう、対照群及び参照基準を設けることが勧められる。

当局は、試料の採取、保管、及びマイクロアレイ・データ生成のための試料・アレイ処理のあらゆる側面をカバーする、妥当性確認済みの SOP を用いることを勧める。全ての作業者が研究開始に先立ち、全てのプロトコルについて十分に訓練を受けるべきである。また、全ての機器について適切な保守スケジュールを立て、試験所環境が SOP に従って維持されることを確保することも望ましい。

C. マイクロアレイ向けのハイブリダイゼーション

提出資料パッケージに、アレイ・ハイブリダイゼーションの再現性及び正確性に関する情報を含めるべきである。DNA マイクロアレイ技術について幅広く許容された QA/QC 統制基準がない場合、或いは DNA マイクロアレイ実験から得られた結果の信頼性の立証方法に関してコンセンサスが得られていない場合、当局は、品質及び信頼性に関する内部統制基準を確立し評価することを勧める。例えば、一部の組織では異常値のアレイを排除するための QA/QC 合否フィルターを用いており、また一部のアレイ製造業者が一定のプラットフォーム特有の QC 測定向けに閾値を推奨している。

現在、ERCC（外部 RNA 統制コンソーシアム）¹¹ や MAQC（マイクロアレイ品質管理コンソーシアム）の各グループがスパイクインや参照基準の開発を進めており、これらは利用可能になれば特定のマイクロアレイ実験の質的評価に役立つと考えられる。また別の最近の取り組みにおいて、ラット DNA マイクロアレイに使用するための一対の参照 RNA プールを生み出しており、これにより正確性、再現性、ダイナミックレンジの評価が可能である。¹² 概念的に、この戦略はヒトを含めあらゆる生物を対象に基準物質の生産に利用できる。そうした独立的資源が幅広く利用可能となり、合意された品質基準がマイクロアレイ業界によって開発及び実施されるようになるまで、現状ではマイクロアレイ製造業者が推奨する手順を入念に守ることで、成功事例がもたらされる。主要な DNA マイクロアレイ製造業者により詳細なプロトコルが策定されており、MAQC の Web サイトに掲載されている。¹² マイクロアレイ分野は日々進化していることから、留意すべき重要な点として、製造業者は時々、この技術の継続的改良を反映させる形でプローブ配列やプロトコルに変更を加えている。品質管理の材料や方法の源泉に関わりなく、当局は、貴殿が使用するものを選んだ方法や、貴殿の目的に対してそれらが許容可能であると判断した経緯について記述することを勧める。

当局は以下の事項について、概要を明確に図式化することを勧める。

・マイクロアレイ・チップの詳細

提出資料パッケージにおいて鍵となる情報は、使用したマイクロアレイ・チップに関する情報である。マイクロアレイ・チップは少なくとも 2 種類、市販チップと特注チップがある（スポンサー又は請負業者が製造したアレイ）。

1. 市販チップを研究に使用する場合、スポンサーは次に挙げる情報を提供すべきである：製造者名、アレイの種類、ロット番号、製造日（又は有効期限）、アレイ QC パラメータ（ベンダーが実施した QC 試験）。

2. 特注チップを研究に使用する場合、スポンサーは次に挙げる情報を提供すべきである：製造プロトコル、ベンダーからの文書（何か市販の材料を購入した場合）、QC 閾値及び QC 試験結果。

・ マイクロアレイ実験の設計詳細

当局は、試料の処理及びラベリングに関する情報を含めるよう勧める（例：処理した試料のバッチは同一か別々か／全ての試料に同じ手順を用いたか／技術的複製、生物学的複製及びその他、該当する情報）。

・ データの生成方法及び分析方法

1 つのアプローチとして、主要データの取得方法から始めることが挙げられる（例：画像取得用のレーザースキャナー設定、ソフトウェア設定）。当局は、個々のマイクロアレイからのデータの統合方法及び正規化方法について説明し、次いでデータ・フィルタリング、データ分析、統計的検定及びその他、適切な情報を提供することを勧める。

D. マイクロアレイ用蛍光リーダー設定

マイクロアレイ技術では多段階工程を用いるが、その中で各段階での変動性を低減することにより、実験的アーチファクトからではなく生物学から生じる変化を検出できる確率を最大限に高めなければならない。マイクロアレイ信号の収集に使用するスキャナーは、この技術から得られるデータの変動性の潜在的発生源である。最近の文献において、上質のマイクロアレイ・データを得る上での最適なリーダー設定の重要性を指摘している。¹³ 信号読み出しシステムは、各 DNA マイクロアレイ・スポットからの信号を定量化するブラックボックスと見なされることが多い。DNA マイクロアレイ技術による RNA 種の存在量測定では、スキャナーからの信号読み出しと染料濃度の間の線形関係を想定し、それはさらに、RNA 試料中の転写量とも線形の相関関係にあると想定される。

個々のアレイ・システム、スキャナーの種類、信号伝達染料の組み合わせは特有の線形ダイナミックレンジを持つ場合があり、これらは電圧利得に応じて変化する。スキャナーに関して重要な勧告は、以下を含め、データ収集における技術的変動性を最小限に抑え、一貫性を向上させる上で役立つであろう。

1. 製造業者からの推奨通りのスキャナーの較正
2. 濃度に左右される読み出しの特性評価を考慮に入れた較正のための、標準化されたスキャナー基準物質の恒常的使用
3. スキャナー設定（例：レーザ出力及び電圧利得）への留意。特に当局は、線形ダイナミックレンジが最大となるスキャナー設定を勧める。
4. 研究の間、スキャナーのレーザ出力及び電圧の設定を一定に保つこと。注意点として、スキャナーの中には調節可能でないものもあり、その場合、この変動性発生源は排除される。

5. 信号出力に対する染料強度の関係が定義される場合、信号が線形ダイナミックレンジの範囲から外れた場合に補正が可能であり、その結果、非常に高い、又は非常に低い信号レンジでの変動性を低減可能であること
6. スキャナー設定及び校正情報を、提出資料パッケージの一部として提出すること

E. 差次的発現遺伝子

マイクロアレイ実験から派生した特定の遺伝子セットを、定義された背景における特定のエンドポイント向けのゲノムバイオマーカーとして提案することができる。そうした特定の遺伝子セットは、分析プロトコルがスポンサーからの報告と同一であれば、再検討の上で再現されるべきである。スポンサーは提出資料の中に、ゲノム関連提出資料における各段階、パラメータ、差次的発現遺伝子リストに結び付くアルゴリズムに関する明瞭な説明を含めるべきである。

分析プロトコルが異なると、差次的発現遺伝子リストのリストも異なってくる可能性があり、これはゲノムバイオマーカーとして提案されるならば、生物学的解釈だけでは正当化できない。これらのゲノムバイオマーカーのセットが医薬品開発又は治療用途における意思決定プロセスの要素となる範囲で、当局は、マイクロアレイから他のプラットフォーム（定量的 RT-PCR など）へのゲノバイオマーカーのセットの転換について、これらの差次的発現遺伝子が敏感、特異的、かつ再現可能であるとスポンサーが結論付けた後に限り、試行することを勧める。

差次的発現遺伝子リストが判定される段階に至るまでの、マイクロアレイ・データの変動性発生源は、本書に記載の勧告に従うことで最小限に抑えることができる。実際にどの遺伝子が差次的発現遺伝子であるか判定するには、以下のように交絡効果を及ぼす可能性のある多数の要因を考慮する必要がある。

- ・ プラットフォーム特有のフラグの適用
- ・ 低強度転写の拒否基準
- ・ 異常値ハイブリダイゼーションの拒否基準
- ・ プラットフォーム特有の正規化プロトコル
- ・ 差次的発現遺伝子を選定するためのデータ分析プロトコル

現時点では、これらの要因それぞれの適切な選択に関して、まだ合意が形成されていない。スポンサーは、これらの要因それぞれに対するパラメータ及びプロトコルの選択方法に留意すべきであり、また合意形成に向けた努力に関して、最新の文献を参照すべきである。

14, 15, 16, 17, 18, 19

原則として、十分な数の技術的複製及び生物学的複製を対象に差次的発現遺伝子リストを判定するに当たり、いくつかの分析プロトコルを用いることができる。実際、技術的複製及び生物学的複製の数に対する制約が、ゲノム関連提出資料における規範となりそうである。例えば、技術的複製は、個々の生物学的試料のハイブリダイゼーションに必要な RNA の最小量に制約される。臨床試料及び臨床前試料はいずれも、個々の生物学的試料から入手可能な RNA の総量を大きく制約し得る。生物学的複製は、研究に含まれる対象の総数に制約される。当局

は、差次的発現遺伝子を判定するための分析プロトコルを選定する際、これらの制約を考慮に入れることを勧める。

F. 差次的発現遺伝子リストの生物学的解釈

様々な統計ツールや分析ツールを通じて差次的発現遺伝子リストが一旦生成されれば、プロセスにおける次の段階で、遺伝子発現の変化の生物学的意味を解釈し、そして生物学的経路が医薬品の作用機序に対して機能的関連性を帯びているかどうか、或いは安全性及び／又は効能と相互に関連付けられるかどうか判断すべきである。

この段階で、例えば以下を含め、多数の疑問に対処すべきである。

- ・ 特定の経路又は複合的経路からの遺伝子が、リストの中で著しく過多でないか。
- ・ 影響を受ける経路がどの程度存在するか。
- ・ 作用機序を、修正された経路の機能から、或いはそれらの経路内での遺伝子にまたがる発現パターンから推察できるか。
- ・ 生物学的プロセスに関連する、経路の組織特異性及び遺伝子機能はどのようなものか。
- ・ 薬理学的又は毒物学的特性が既知の、他の（関連又は非関連）化合物での処置との関連で、特定の経路における修正の度合い及び／又はパターンはどうか。

現時点で、これらの疑問全てに対して答えを見出す目的で利用できる単一のツールはないが、複数のツールを組み合わせれば、関心の的となる特定の疑問に対して可能な限り綿密に対応できる。この目的に対し、様々な分析プラットフォームが用意されているが、Web 上から無償で入手できるものもあれば、市販製品を購入して入手できるものもある。

得られた生物学的解釈が複数の異なるデータベースと重なり合えば、解釈がどうあるべきかに関する合意形成を促し得る。ただし、常にそうとは限らない。合意形成は多数の要因に阻害される可能性もあり、例えば関心の的となる化合物に関する情報が参照データベースに存在しない場合、或いは関心の的となる特定の経路に対する注釈の欠如などが挙げられる。例えば、遺伝子のサブセットを1つの系統内の特定の経路に置くことができるが、それらが別の経路分析ツールでは同じ経路に表されない場合がある。経路分析データベースにおいて、文献からどの内容を引き出すかによって、また引き出し方法（キュレーションが自動か手作業か）によっても情報が異なる可能性がある。加えて、極めて重要な区別は全ての情報を引き出すのか、或いは文献に記載の直接的実験証拠によって裏付けられる情報のみ引き出すのか、という区別である。当局は、特定の遺伝子リストに関する機能的情報を引き出し、関連する一連の遺伝子の生物学的意義に関して仮説を立てる際、文献及び参照データベースを大いに頼りとすることを勧める。

また当局は、あるスポンサーから提案された遺伝子セットの生物学的意義に、規制上の審査官による解釈の妥当性の分析及び評価の再現を可能にするような、標準的な一連の情報を添えることも勧める。加えて、当局は、スポンサーから提案される遺伝子セットの妥当性について、Q-PTR 又は RT-PCR など他の従来の技法によって確認することも勧める。そうした情報には例えば以下の要素などが含まれるべきである。

- ・ベンダー名など、注釈に使用するデータベースの種類
- ・データベース内で過多の経路の特定に用いる方法及びアプローチ（除外、統計的検定）
- ・ユーザー定義による注釈の正当化に用いる参考文献
- ・経路注釈結果の解釈に関するスポンサーによる要約

III. 遺伝子型判定

A. 遺伝子型判定方法

個体間の遺伝的差異は、染色体配置或いはコピー数の変化から単一の塩基対の変化に至るまで、様々な形で発生する。現在、薬理遺伝学で利用されている遺伝的変動の大半は、個々の遺伝子レベルで発生しており（例：薬物代謝酵素）、その規模は単一の塩基対の変化から、遺伝子全体の重複又は欠失に及ぶ。大抵、ゲノム DNA の検査が最も信頼性があり実用的な、遺伝的変動の特性評価方法であるが、タンパク質又は mRNA の発現レベルを基本とする方法が、癌又はウイルス感染における治療感受性の判定など、状況によっては好ましい場合もある。現在、多数の方法を DNA 変動の特性評価に利用できるほか、新しい方法の開発も急速に進んでいる。

B. DNA の分離、取扱い及び特性評価

臨床研究環境でのゲノム DNA の抽出には、全血が一般によく用いられる。採血管は概して EDTA、CPD、ACD、クエン酸又はヘパリンなど、抗凝血剤を使用する。血液試料中の DNA は、適切に保管しないと劣化しやすい。採血管製造業者は通常、安定性が最適となる適切な保管条件を推奨するが、当局は、全長 DNA の存在確認などにより、アッセイに適する DNA をこれらの条件下で得られることを確保するよう勧める。

DNA を血液から分離する際、塩基、フェノール、エタノール、ヘム等の汚染物質のキャリーオーバー（DNA 分離時の）や、従来型の精製手順から生じる洗浄剤が、下流の用途における DNA の性能を阻害するおそれがある。加えて、抗凝血剤ヘパリンによる汚染は、PCR による増幅を阻害する。^{20, 21} 分離手順における汚染や干渉の潜在性を評価すべきであると共に、これらの回避策を必要に応じて実施すべきである。

DNA は比較的安定した分子であるが、保管には注意すべきである。DNA の劣化は、得られる結果に重大な影響を及ぼし、定量誤差と定性誤差の双方を生じる可能性がある。DNA 劣化を招く可能性のある要因はいくつかあり、例えば酵素的活性ヌクレアーゼの導入、酸加水分解、凍結融解サイクルの反復に起因する劣化などが挙げられる。DNA の取扱い及び保管手順は、上記及びその他、DNA の品質に影響を及ぼし得る要因を抑制する形で実施すべきである。例えば以下が挙げられる。

- ・試験所の機器表面や試薬中に存在し得るヌクレアーゼへの DNA 溶液曝露を避ける
- ・分離後の DNA は弱アルカリ pH（例：トリス EDTA 緩衝剤）の状態で保管する
- ・-20°C 又は -80°C での DNA の長期保管維持
- ・凍結融解による劣化を低減するよう、試料をアリコート中で凍結する

C. 遺伝子型判定報告

当局は、ゲノム関連提出資料の種類を問わず、遺伝子型判定報告書に下記の情報を含めることを勧める（規制上の要件については「薬理ゲノミクス・データ提出要項」参照）。

- ・ アッセイ・プラットフォーム又は方法論の説明
- ・ 研究対象試料について、人口統計学的データ及び試料サイズにおける遺伝子型／臨床表現型相関関係の正当化事由、民族／人種区分の適度なカバー範囲を含む情報。異なる集団における対立遺伝子頻度の予測も含めること。
- ・ 対立遺伝子測定結果及び代謝状態指定との相関関係
- －代謝酵素の場合、EM（高代謝者）、PM（低代謝者）、IM（中代謝者）、又は UM（超迅速代謝者）の判定方法
- －試料試験報告書
- －新規遺伝子の場合、遺伝子変異とコード化されたタンパク質活性の相関関係
- ・ アッセイが CLIA 公認の試験所又は研究所で実施されたか否か

IV. 習熟度試験

高品質のデータは、信頼できる生物学的結論をマイクロアレイ遺伝子発現研究から引き出すための基盤である。しかし、同じプラットフォームを別々の試験所で用いた場合、既刊のデータセットにおけるデータ品質に大幅な差異が見受けられる。^{22, 23} 多くの場合、低質なマイクロアレイ・データの原因はプラットフォーム特有の品質問題ではなく、そのデータを生成した試験所の技術的習熟度の不測にあった。試験所におけるそうした体系的な手順上の障害は、その試験所が手順上の障害の問題を抱えていることを認識していないおそれがあることから、異常なアレイに繋がるハイブリダイゼーションの無作為な失敗よりはるかに深刻な問題である。

FDA は、ゲノム関連提出資料に記載のデータを生成した試験所の適格性を FDA の審査官が客観的に査定できるようなデータの提供を、スポンサーへ勧告する。多数の研究において、品質管理基準を報告している、或いはマイクロアレイ・データの内部評価を提供するための標準を用いている。この情報は、個別の研究の範囲内で所定のアッセイを再現可能な形で行う技術力の確認に役立つ。

試験所内試験に加え、施設の総体的能力の評価も、習熟度試験など試験所間比較を通じて実施可能である。試験所の習熟度は、多数のアプローチを通じて観察可能である。

・ RNA ソース

FDA が主導した 2 つのイニシアティブで、習熟度試験向けの参照 RNA 試料を開発し、特性評価を行ってきた。ラット RNA 試料の混合組織プールが、組織選択的遺伝子の違いが周知の形で考案され²⁴、マイクロアレイ試験所向けの初回習熟度試験プログラムで使用されている。²⁵ 加えて、マイクロアレイ品質管理（MAQC）プロジェクト²⁶ が 2 つのヒト基準物質を開発し、多様な遺伝子発現プラットフォームを対象に幅広く試験を行ってきた。双方のイニシアティブからのデータは公共データベースに収蔵されており、また MAQC プロジェクトで使

用された RNA 試料は現在、試験所が MAQC データの再現能力を評価する目的で使えるよう市販されている。

・ 習熟度試験向け実験設計

RNA ベースのゲノムアッセイは大抵、差次的発現遺伝子又はプロファイルの検出を目的に考案されている。これらのアッセイ向けの習熟度試験プログラムは、差次的遺伝子発現を繰り返し検出する能力の評価を目的に、転写存在量が既知の、生物学的に異なる 2 つの試料の複製に関する試験を中心に据えるとよい。例えば、試験所は試料 A の複製を 3 個以上（A1、A2、A3 と表示）、試料 B の複製を 3 個以上（B1、B2、B3 と表示）処理することにより、反復可能な強度測定と反復可能な差次的遺伝子発現検出の両面での試験所内反復可能性査定する計画を立てるとよい。複数の試験所が同じ RNA 試料及び同じプラットフォームを使用して生成したデータを提供する場合、発現の差異検出に関するサイト間の再現性及び比較可能性を評価することができる。当局は、試験所が習熟度試験プログラムを活用すること、そして試験が通年で繰り返し実施されることで同じ試験所からの複数のデータセットを比較して、試験所の長期にわたる能力の一貫性を確認することを勧める。

・ 試験所の適合性

FDA はマイクロアレイ施設に対し、21 CFR 58 に概要が記されている優良試験所規範の順守を奨励する。試験所は、マイクロアレイ・データが臨床用途又は診断用途に使える見込みがある場合、CMS/CLIA 認定の取得を希望してもよい。CLIA 準拠アッセイは全て、個々の試験所の適格性を検証できるよう、他のデータ提供者とのデータ比較の反復が必要である。習熟度試験プログラムへの参加は、この CLIA 要件を満たすことになる。

V. 臨床研究報告書におけるゲノミクス・データ

ゲノミクス・データ提出向けに利用可能なデータソースが多数ある。臨床研究からのゲノミクス・データは、マイクロアレイ発現プロファイリング、遺伝子型判定又は単一ヌクレオチド多型（SNP）実験から、或いはその他、薬物の投与又は代謝、安全性評価、又は効能査定との関連で進化している分析方法論から得られる場合がある。またゲノミクス・データは、臨床研究又は非臨床研究からの効能データ又は安全性データなど、他のデータも同時に報告される研究から報告される場合もある。ただし、これらのデータを再検討可能なのは、提出資料に含まれる臨床データ報告書の内容に、試料選定に関する十分に詳細な記述がある場合に限られる。

以下に、FDA への（自主的提出を含む）提出時にゲノミクス・データと併せて提出すべきデータに関する FDA の現在の考え方を記す。これらのデータに関する規制上の申請については、IND、NDA、BLA のほか、自主的ゲノミクス・データ提出（VGDS）に関する FDA の要件を満たす薬理ゲノミクス・データの提出向けの様々なアルゴリズムを背景に、FDA の「薬理ゲノミクス・データ提出要項」ガイダンスに詳しく記されている。下記の論考全体を通じて、貴殿においてはこの論考に関する詳細な背景について「薬理ゲノミクス・データ提出要項」ガイダンスを参照していただきたい。

あらゆるゲノム関連提出資料において、完全な臨床研究報告書が FDA 審査官にとって非常に役立つ。報告書においては、研究の重要な設計上の特徴の選定形態の明確な説明のほか、研究の計画、方法、並びに研究における曖昧さを排除するための研究の指揮が行われた形態に関する十分な情報も提供すべきである。報告書は附属書と併せて、人口統計学的データ及び基準データ、並びに重要な分析を再現可能な妥当性確認報告書など分析方法も含め、薬理ゲノミクスに関連する個々のデータも提供すべきである。また特に重要な点として、全ての分析結果及び図表に、データ生成の源泉となった一連の患者の識別情報も明示すべきである。

提出資料の有用性を高めるため、当局は、ゲノミクス実験に関する臨床セクションの記載内容に以下の情報が含まれることを勧める。

- 表紙
- 目次
- 概要及び所見要約
- 背景及び科学的論拠
- 研究の主たる目標及び二次的目標
- 研究設計、試料採取・保管方法、薬理ゲノミクスの方法
- 臨床研究プロトコル（以下を最低限含むこと）²⁷
- 包含／除外基準
- 人口統計学的データ
- 薬物動態学／薬力学データセット及び試験所結果を含む患者別の試験測定結果のリスト、欠落データの説明
- 患者の病状
- 個々の有害事象又は試験所での異常
- 薬理ゲノミクス及びその他のバイオマーカー・データセット（必要に応じて）
- 臨床データと薬理ゲノミクス・データの相関関係
- 全ての無作為化された患者におけるゲノミクス・データの包括性、並びに係る情報が失われた場合における推察及び関連付けへの影響、特に結果を伴う影響に関する論考
- 付加的論考及び結論
- 参考文献及び補足資料

テーマの具体的な順序や区分は、特定の研究についてより論理的な代案があれば、変更してよい。「薬理ゲノミクス・データ提出要項」ガイダンス及びその他、FDA の規制及びガイダンスに、特定の規制要件に関する詳細な論考が記されている。

臨床データについて好ましい提出標準は、臨床データ互換標準コンソーシアム（CDISC）による「研究データ作表モデル」（SDTM）標準である。この標準について詳しくは、FDA のデータ標準評議会の Web サイト²⁸を参照のこと。²⁹

VI. 非臨床毒物学研究からのゲノミクス・データ

ゲノミクス・データは、毒物ゲノミクス研究など非臨床研究でも収集できる。このセクションでは非臨床毒物学データを、ゲノミクス・データ提出時に併せて提出する方法について記述する。データ提出方法は、提出目的次第で決まる。概して以下の3種類の提出形態が挙げられる。

- ・1つ目の提出形態は、選定過程基準の拡大を目的とするものが考えられる（即ち臨床開発向けの主要な化合物の選定に役立てるための、或いは一定の特性を持つ化合物を排除するための選別）。
- ・2つ目は、特定の化合物の特性評価を示すものが考えられる。
- ・3つ目は、化合物／化合物区分の開発とは無関係と考えられる全般的な科学的論考を提示するものが挙げられる。

A. 選定過程基準の拡大

提出の意図が選定過程基準の拡大及び化合物開発に先行することにある場合（即ち主要な化合物の選別又は一定の特性の排除のための選別）、当局は下記の情報を含めるよう勧める。

1. 提出される申請の目的に関する全般的な説明、並びに化合物、使用目的、作用機序に関する簡単な説明
2. 提出される研究の目的及び実験設計（処置、持続期間、複製、製剤、投与経路、用量選定の論拠）。該当する場合、種、株、性別、遺伝的背景、年齢、体重、発達段階、試料採取元の器官／組織、細胞の種類を含めてよい。当局は、試料の取扱い、保管及び調製方法論に関する簡単な説明も含めるよう勧める。
3. STP ガイドラインと整合的な臨床病理学データ（血清化学及び血液学）及び組織病理学データを含む毒物学的パラメータ（Toxicologic Pathology, 32, 126-131 (2004)、電子形式が望ましい）。該当する場合、病理学所見と遺伝子変動或いは遺伝子発現又はタンパク質発現の相関関係を説明すべきである。
4. 遺伝子変動或いは遺伝子発現又はタンパク質発現に対する個々の動物データの相関関係を説明すべきである。
5. 化合物の薬理動態学的パラメータ及び ADME 特性を、判明していれば提示すべきである。該当する場合、薬理動態学的所見と遺伝子変動或いは遺伝子発現又はタンパク質発現の相関関係を強調すべきである。
6. 遺伝子変動或いは遺伝子発現又はタンパク質発現に関して、遺伝子型判定又は発現プロファイリングの方法、統計的方法、及び使用したソフトウェア・パッケージを含め、科学的方法及び分析方法に言及すべきである。

B. 特定の化合物の特性評価

提出の意図が特定の化合物の特性評価にある場合、概して推奨されるのは、提出資料における毒物学部分を、毒物学報告書と同様の形式で報告することである。係る報告書は、優良審査規範のテンプレートに従うことになる（セクション 4.1 m（1～6））。このテンプレートを使用しない場合、試験プロトコルの複本に一覧表を添付し、また概して臨床徴候、死亡率、体重、食物消費、血液学、臨床化学、検尿結果、肉眼的病理学、器官重量、組織病理学、及び薬理／毒物動態学（入手可能な範囲に応じて）、併せて詳細審査に適する完全に表形式化されたデータを含めるべきである。これらのデータにはデータポイントの要約表と併せて個々の動物についての試験所データポイントを含む個々のデータポイントの一覧表が含まれる。試験プロトコルの複本に、一覧表が添付されることが望ましい。

C. 全般的な科学的論考

提出資料に、化合物及び／又は化合物区分の開発と必ずしも関連するわけではない全般的な科学的論考の裏付けとなるデータが含まれる場合、提出対象となる非臨床データの最小量は、前述のシナリオの場合と同等であるべきである。

ただし、論じられる科学的争点を明瞭化及び裏付けるための適度な情報の提供は、スポンサーの意思に委ねられる。提出されるデータはおそらく詳細なデータとはならないが、当局は、提出の具体的な目的について簡潔かつ適度に記述的となるよう、表形式化するよう勧める。

VII. データ提出形式

ゲノミクス・データ提出資料に関連する臨床データ及び非臨床データの全般的記述は、本ガイダンスのセクション III 及び IV に記載されている。このセクションではゲノミクス・データ及び関連する非臨床データ又は臨床データについて、電子的データ提出形式を詳しく説明する。

A. 提出標準

如何なる類のゲノミクス・データ提出についても、当局は、CDISC ガイドラインに従った CDISC の SDTM 標準又は非臨床データ交換標準 (SEND) の SDTM 標準に適合する、タブ区切りファイル形式で電子的に提出するよう奨励する (<http://www.cdisc.org/>)。³⁰

B. マイクロアレイ遺伝子発現データ

マイクロアレイ遺伝子発現実験がゲノミクス・データ提出資料に含まれる場合、遺伝子発現の原データと正規化データの双方に加え、提出資料における生物学的結論の裏付けに用いられる遺伝子リストも、電子的手段により提出すべきである。

- ・ 原データ – アレイ毎にファイル 1 本を提出することが勧められる。例えば、CEL ファイルが Affymetrix GeneChip プラットフォーム向けに提出されることになる一方、タブ区切りスプレッドシート形式を他のプラットフォーム向けに、遺伝子 ID (例: GenBank アカウント番号、製造業者 ID) を 1 列目に記載して利用してよい。
- ・ 正規化データ – アレイ毎にファイル 1 本を提出することが勧められる。タブ区切りスプレッドシート形式を、遺伝子 ID (例: GenBank アカウント番号、製造業者 ID) を 1 列目に記載して使用すべきである。
- ・ 遺伝子リスト – 提出資料における生物学的解釈の裏付けとなる遺伝子リストを含めるべきである。各アレイのプローブセット ID を、このリストの各入力欄で識別すべきである。このリストは、各対象遺伝子の倍率変化や p 値などのパラメータをタブ区切り形式で記載したものと併せて提出すべきである。
- ・ 上記のパラメータに加え、遺伝子リスト (又は結果) 提出資料に下記の情報も含めるべきである。

_データ分析に使用したソフトウェア

_フィルタリング条件 (例: 強度フィルター、スポットフラグフィルター、スポットサイズフィルター、検出呼び出しフィルター)

_データ分析用に選定した正規化方法（中央値、Lowess やハウスキーピング遺伝子正規化など様々な正規化方法を利用可能）

_統計分析用に選定した方法

データファイルに加え、実験要約表（附属書 I で ExpSumTable と命名）を作成し、この表にマイクロアレイ研究で調査した主な実験パラメータを要約すべきである。実験パラメータは、MIAME（マイクロアレイ実験に関する最低限の情報）ガイドラインに従って作成すべきである。

C. 臨床データ及び非臨床データ

CDISC と SEND 双方を包含する研究データ作表モデル（SDTM）が、臨床データと非臨床データ双方について編成、構造及び形式の指針となるよう開発されている。ゲノミクス・データ提出の場合、臨床データと非臨床データを SDTM に従って作成すべきである。CDISC 及び SEND では領域のコンセプトの下で研究データを編成している。各領域で観察結果を集めて要約し、テーマ別の共通事項を併記する形式である。現時点で当局は、各領域をタブ区切り形式の別々のファイルとして作成するよう求める。附属書 II では非臨床データ提出向けのデータフォーマットを提示している。

附属書 I：実験結果要約表（EXPSUMTABLE）

ExpSumTable は、マイクロアレイ研究における主な実験パラメータの調査結果の要約表である。左から 3 列は必須である。1 列目と 2 列目はそれぞれ対象 ID（例：動物 ID）とアレイ ID を提示する。マイクロアレイ原データファイル名が 3 列目で指定される。残りの列はアレイデータを分析向けに分類する際に利用できる主な実験パラメータを提示する。スポンサーは、データを分析に役立つパラメータを ExpSumTable に含めることを検討すべきである。

対象 ID	アレイ ID	ファイル名	用量 (ppk)	組織	化学	...
1	Ctl_1	Ctl_1.cel	0	肝臓	コーン油	...
2	Ctl_2	Ctl_2.cel	0	肝臓	コーン油	...
3	Ctl_3	Ctl_3.cel	0	肝臓	コーン油	...
4	Ctl_4	Ctl_4.cel	0	肝臓	コーン油	...
5	Ctl_5	Ctl_5.cel	0	肝臓	コーン油	...
6	Ctl_6	Ctl_6.cel	0	肝臓	コーン油	...
7	Ctl_7	Ctl_7.cel	0	肝臓	コーン油	...
8	Ctl_8	Ctl_8.cel	0	肝臓	コーン油	...
9	Ctl_9	Ctl_9.cel	0	肝臓	コーン油	...
10	Ctl_10	Ctl_10.cel	0	肝臓	コーン油	...
11	Ctl_11	Ctl_11.cel	0	肝臓	コーン油	...
12	Treat_1	Treat_1.cel	10	肝臓	化合物 1	...
13	Treat_2	Treat_2.cel	50	肝臓	化合物 1	...
14	Treat_3	Treat_3.cel	100	肝臓	化合物 1	...
15	Treat_4	Treat_4.cel	10	肝臓	化合物 2	...
16	Treat_5	Treat_5.cel	50	肝臓	化合物 2	...
17	Treat_6	Treat_6.cel	100	肝臓	化合物 2	...
18	Treat_7	Treat_7.cel	10	肝臓	化合物 3	...

19	Treat_8	Treat_8.cel	50	肝臓	化合物 3	...
20	Treat_9	Treat_9.cel	100	肝臓	化合物 3	...
21	Treat_10	Treat_10.cel	10	肝臓	化合物 4	...
22	Treat_11	Treat_11.cel	50	肝臓	化合物 4	...
23	Treat_12	Treat_12.cel	100	肝臓	化合物 4	...

附属書 II：非臨床研究データ提出見本

ゲノミクス・データ提出資料に含まれる非臨床データの作成について、下記の仮説的見本を通じて解説する。SEND 形式でのデータ作成について詳しくは以下参照：

<http://www.cdisc.org/models/send/v2.3/SENDV2.3ImplementationGuide.pdf>.

この実験見本の目的は、肝臓毒性に関連すると考えられる遺伝子発現パターンの特定である。この研究では 10 匹のラットを使用し、5 匹を対照群とし、5 匹には医薬品 X を 6 日間の反復投与実験にて経口投与した。マイクロアレイ遺伝子発現及び臨床病理学データが、この研究で各ラットについて報告された。ゲノミクス・データ提出資料向けに、領域 1～6 が必要である。この研究にその領域が適用されるかについては、上記の SEND 実践ガイドを参照のこと。短い名称を使用し、列名（変数）を表す 2 文字の領域コードを先頭に付けることが重要である。

領域 1：研究設計要約

SSPARMC D	SSPAR	SSVAL	SSSEQ
STTYP	研究種別	反復投与毒性	1
LBNAM	試験所名	XYZ 社	2
	試験所		
LBLOC	所在地	都市名、州名	3
SPECIES	種	ラット	4
STRAIN	株	Sprague-Dawley	5
DESIGN	研究設計	並行	6
	最終死亡		
TRMSAC	期間	1～6 日間	7
GLPTYP	GLP 種別	FDA	8
QARPT	QA 報告書	あり	9
DURDOS	投与持続期間	6 日間	10
		オスの Sprague-Dawley ラットにおける 6 日間経口毒性研究	
STTITL	研究表題	医薬品による処置	11
ALTSTDID	代替研究 ID	提出 ID 123456	12
SENDVER	SEND バージョン	2.3	13
STDTC	存命開始日	2001 年 5 月 1 日	14
ENDTC	存命終了日	2001 年 7 月 1 日	15

領域 2：対象特性

USUBJID	ARMCD	SCTESTCD	SCORRES	SCTEST	SCSTRES	SCSEQ	
	D	D	S		C		
1		1	SEX	Male	性別	オス	1
2		1	SEX	Male	性別	オス	2
3		1	SEX	Male	性別	オス	3
4		1	SEX	Male	性別	オス	4
5		1	SEX	Male	性別	オス	5
6		2	SEX	Male	性別	オス	6
7		2	SEX	Male	性別	オス	7
8		2	SEX	Male	性別	オス	8
9		2	SEX	Male	性別	オス	9
10		2	SEX	Male	性別	オス	10

領域 3：群特性

ARMCD	GCTESTCD	GSCORRES	GCTEST	GCSRESC	GCSEQ
1	GRPNAM	Low-dose	群名	低用量	1
1	CTLGRPDL	N	対照群フラグ	N	2
2	GRPNAM	Control	群名	対照群	3
2	CTLGRPDL	Y	対照群フラグ	Y	4

領域 4 : 曝露

USUBJID	ARMCD	EXTRT	EXTRTV	EXDOSE	EXDOSU	EXDOSFRQ	EXDOSFRM	EXDOSTOT	EXROUTE	EXDUR	EXGRP1D	EXSEQ	STDY*	ENDY*
1	1	X	Labrafil	10	mg/kg	1 日 1 回	液体	10	経口	P6D	1	1	1	6
2	1	X	Labrafil	10	mg/kg	1 日 1 回	液体	10	経口	P6D	1	2	1	6
3	1	X	Labrafil	10	mg/kg	1 日 1 回	液体	10	経口	P6D	1	3	1	6
4	1	X	Labrafil	10	mg/kg	1 日 1 回	液体	10	経口	P6D	1	4	1	6
5	1	X	Labrafil	10	mg/kg	1 日 1 回	液体	10	経口	P6D	1	5	1	6
6	2	賦形剤	Labrafil	10	mg/kg	1 日 1 回	液体	10	経口	P6D	2	6	1	6
7	2	賦形剤	Labrafil	10	mg/kg	1 日 1 回	液体	0	経口	P6D	2	7	1	6
8	2	賦形剤	Labrafil	10	mg/kg	1 日 1 回	液体	0	経口	P6D	2	8	1	6
9	2	賦形剤	Labrafil	10	mg/kg	1 日 1 回	液体	0	経口	P6D	2	9	1	6
10	2	賦形剤	Labrafil	10	mg/kg	1 日 1 回	液体	0	経口	P6D	2	10	1	6

* 全般的 SDTM タイミングフィールド、常時許容（以下の SDTM 文書の 225 項参照：

<http://www.fda.gov/cder/regulatory/ersr/Studydata-v1.1.pdf>）

領域 5：臨床病理学

USUB JID	CPTE TCD	CPST ESN	CPSTR ESU	CPSP EC	CPC AT	CPSC AT	CPTE ST	CPSTR ESC	CPOR RES	CPORR ESU	CPGR PID	CPS EQ	DY *
1	MONO	0.48 4	10E+9 /L	血液	HEM	化学 分析	単球 数	0.484	0.48 4	10E+9 /L	1	1	6
2	MONO	0.41 8	10E+9 /L	血液	HEM	化学 分析	単球 数	0.418	0.41 8	10E+9 /L	1	2	6
3	MONO	0.42 9	10E+9 /L	血液	HEM	化学 分析	単球 数	0.429	0.42 9	10E+9 /L	1	3	6
4	MONO	0.44 7	10E+9 /L	血液	HEM	化学 分析	単球 数	0.447	0.44 7	10E+9 /L	1	4	6
5	MONO	0.47 1	10E+9 /L	血液	HEM	化学 分析	単球 数	0.471	0.47 1	10E+9 /L	1	5	6
6	MONO	0.44 1	10E+9 /L	血液	HEM	化学 分析	単球 数	0.441	0.44 1	10E+9 /L	2	6	6
7	MONO	0.40 7	10E+9 /L	血液	HEM	化学 分析	単球 数	0.407	0.40 7	10E+9 /L	2	7	6
8	MONO	0.44 8	10E+9 /L	血液	HEM	化学 分析	単球 数	0.448	0.44 8	10E+9 /L	2	8	6
9	MONO	0.40 8	10E+9 /L	血液	HEM	化学 分析	単球 数	0.408	0.40 8	10E+9 /L	2	9	6
10	MONO	0.41 8	10E+9 /L	血液	HEM	化学 分析	単球 数	0.418	0.41 8	10E+9 /L	2	10	6
1	ALT	57	U/L	血液	CHE M	化学 分析	ALT	57	57	U/L	1	11	6
2	ALT	44	U/L	血液	CHE M	化学 分析	ALT	44	44	U/L	1	12	6
3	ALT	42	U/L	血液	CHE M	化学 分析	ALT	42	42	U/L	1	13	6
4	ALT	39	U/L	血液	CHE M	化学 分析	ALT	39	39	U/L	1	14	6
5	ALT	45	U/L	血液	CHE M	化学 分析	ALT	45	45	U/L	1	15	6
6	ALT	39	U/L	血液	CHE M	化学 分析	ALT	39	39	U/L	2	16	6
7	ALT	40	U/L	血液	CHE M	化学 分析	ALT	40	40	U/L	2	17	6
8	ALT	40	U/L	血液	CHE M	化学 分析	ALT	40	40	U/L	2	18	6
9	ALT	39	U/L	血液	CHE M	化学 分析	ALT	39	39	U/L	2	19	6
10	ALT	38	U/L	血液	CHE M	化学 分析	ALT	38	38	U/L	2	20	6

* 全般的 SDTM タイミングフィールド、常時許容（以下の SDTM 文書の 2.2.5 項参照：

<http://www.fda.gov/cder/regulatory/ersr/Studydata-v1.1.pdf>)

領域 6：顕微鏡検査所見

USUBJID	MITESTC			MISTA	MIREASN	MIGRP1	MISE		
D	D	MITEST	MIORRES	T	D	D	Q	DY	
	1	LIVER	肝臓	正常			1	1	6
	2	LIVER	肝臓	正常			1	2	6
	3	LIVER	肝臓	正常			1	3	6
	4	LIVER	肝臓	正常			1	4	6
	5	LIVER	肝臓	正常			1	5	6
	6	LIVER	肝臓	軽度の門脈周 辺空胞形成			2	6	6
	7	LIVER	肝臓	軽度の門脈周 辺空胞形成			2	7	6
	8	LIVER	肝臓	軽度の門脈周 辺空胞形成			2	8	6
	9	LIVER	肝臓	軽度の門脈周 辺空胞形成			2	9	6
	10	LIVER	肝臓	軽度の門脈周 辺空胞形成			2	10	6

¹ This guidance has been prepared by the Center for Drug Evaluation and Research (CDER), the National Center for Toxicological Research (NCTR) and the Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), in cooperation with the Center for Devices and Radiological Health (CDRH) at the Food and Drug Administration.

For the purposes of this guidance, the term *drug* or *drug product* includes human drug and biological products.

Paperwork Reduction Act Public Burden Statement: According to the Paperwork Reduction Act of 1995, a collection of information should display a valid OMB control number. The valid OMB control number for this information collection is 0910-0557 (expires 12/31/2007). The time required to complete this information collection is estimated to average 10 hours per response, including the time to review instructions, search existing data resources, gather the data needed and complete and review the information collection.

² An Analysis of Blood Processing Methods to Prepare Samples for GeneChip Expression Profiling- Technical Note from Affymetrix. (http://www.affymetrix.com/support/technical/technotes/blood_technote.pdf)

³ Fan H. (2005) The transcriptome in blood: challenges and solutions for robust expression profiling. *Current Molecular Medicine* **5**, 3-10.

⁴ Debey S. et al., (2006) A highly standardized, robust, and cost-effective method for genome-wide transcriptome analysis of peripheral blood applicable to large-scale clinical trials. *Genomics* **87**, 653-664.

⁵ Burczynski M.E. and Dorner A.J. (2006) Transcriptional profiling of peripheral blood cells in clinical pharmacogenomic studies. *Pharmacogenomics* **7**, 187-202.

⁶ Baechler E.C. (2004) Expression levels for many genes in human peripheral blood cells are highly sensitive to ex vivo incubation. *Genes and Immunity* **5**, 347-353.

⁷ Debey S. (2004) Comparison of different isolation techniques prior gene expression profiling of blood derived cells: impact on physiological responses, on overall expression and the role of different cell types. *The Pharmacological Journal* **4**, 193-207.

⁸ <http://arrayconsortium.tgen.org/np2/public/qualitycontrol/jsp>.

⁹ Dumur, C.I. et al., (2004) Evaluation of quality-control criteria for microarray gene expression analysis. *Clinical Chemistry* **50**(11), 1994-2002.

¹⁰ Imbeaud S, Graudens E, Boulanger V, Barlet X, Zaborski P, Eveno E, Mueller O, Schroeder A. and Auffray C. (2005) Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. *Nucleic Acids Research* **33**(6), e56.

¹¹ External RNA Controls Consortium. (2005) The External RNA Controls Consortium: a progress report. *Nature Methods* **2**: 731 - 734.

¹² <http://edkb.fda.gov/MAQC/>

¹³ Shi, L., Tong, W., Su, Z., Han, T., Han, J., Puri, R.K., Fang, H., Branham, W.S., Chen, J.J., Xu, Z., Harris, S.C., Hong, H., Xie, Q., Perkins, R.G., and Fuscoe, J.C. (2005). Microarray scanner calibration curves: characteristics and implications. *BMC Bioinformatics* **6** (Suppl 2):S11.

¹⁴ Simon R. Development and evaluation of therapeutically relevant predictive classifiers using gene expression profiling. (2006) *J Natl Cancer Inst.* **98**(17):1169-71.

¹⁵ Simon R. (2006) A checklist for evaluating reports of expression profiling for treatment selection. *Clin Adv Hematol Oncol.* **4**(3):219-24.

¹⁶ Dobbin KK, Simon RM. (2007) Sample size planning for developing classifiers using high dimensional DNA microarray data. *Biostatistics.* **8**(1):101-17.

¹⁷ Varma S, Simon R. (2006) Bias in error estimation when using cross-validation for model selection. *BMC Bioinformatics.* **7**:91.

¹⁸ Guo L, Lobenhofer EK, Wang C, Shippy R, Harris SC, Zhang L, Mei N, Chen T, Herman D, Goodsaid FM, Hurban P,

Phillips KL, Xu J, Deng X, Sun YA, Tong W, Dragan YP, Shi L. (2006) Rat toxicogenomic study reveals analytical consistency across microarray platforms. *Nat Biotechnol.* **24**(9):1162-1169.

¹⁹ Canales RD, Luo Y, Willey JC, Austermiller B, Barbacioru CC, Boysen C, Hunkapiller K, Jensen RV, Knight CR, Lee KY, Ma Y, Maqsoodi B, Papallo A, Peters EH, Poulter K, Ruppel PL, Samaha RR, Shi L, Yang W, Zhang L, Goodsaid FM. (2006) Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms. *Nat Biotechnol.* **24**(9):1115-22.

²⁰ Smythe et al., *BMC Infectious Diseases*, 2002, 2:13.

²¹ Yokota et al., *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 1999, 13: 133 – 140.

²² Shi L, Tong W, Goodsaid F, Frueh FW, Fang H, Han T, Fuscoe JC and Casciano DA (2004) QA/QC: challenges and pitfalls facing the microarray community and regulatory agencies. *Expert Rev Mol Diagn* **4**:761-77.

²³ Shi L, Tong W, Fang H, Scherf U, Han J, Puri RK, Frueh FW, Goodsaid FM, Guo L, Su Z, Han T, Fuscoe JC, Xu ZA, Patterson TA, Hong H, Xie Q, Perkins RG, Chen JJ and Casciano DA (2005) Cross-platform comparability of microarray technology: intra-platform consistency and appropriate data analysis procedures are essential. *BMC Bioinformatics* **6** Suppl 2:S12.

²⁴ Thompson KL, Rosenzweig BA, Pine PS, Retief J, Turpaz Y, Afshari CA, Hamadeh HK, Damore MA, Boedigheimer M, Blomme E, Ciurlionis R, Waring JF, Fuscoe JC, Paules R, Tucker CJ, Fare T, Coffey EM, He Y, Collins PJ, Jarnagin K, Fujimoto S, Ganter B, Kiser G, Kaysser-Kranich T, Sina J and Sistare FD (2005) Use of a mixed tissue RNA design for performance assessments on multiple microarray formats. *Nucleic Acids Res* **33**:e187.

²⁵ Reid LH et al. (2006). Proficiency testing program for microarray facilities (in preparation).
http://www.expressionanalysis.com/proficiency_test.html.

²⁶ Shi L, Reid LH et al (2006) MicroArray Quality Control (MAQC) Project: A comprehensive survey demonstrates concordant results between gene expression technology platforms. *Nat Biotechnol* **24**(9), 1151-1161.

²⁷ ICH guidance *E3 Structure and Content of Clinical Study Reports*.

²⁸ See <http://www.fda.gov/oc/datacouncil/>.

²⁹ The SDTM can be obtained from the CDISC Web site at <http://www.cdisc.org/models/sds/v3.1/index.html>.
SDTM Implementation Guides:

- *The Study Data Tabulation Model Implementation Guide (SDTM-IG) for clinical study data* can be obtained from the CDISC web site at: <http://www.cdisc.org/models/sds/v3.1/index.html>
- *The Study Data Specification for submitting SDTM datasets to CDER* can be obtained at <http://www.fda.gov/cder/regulatory/ersr/Studydata-v1.1.pdf>

³⁰ More information can be found at FDA Data Standards Council Web site, <http://www.fda.gov/oc/datacouncil/>. The *Standard for Exchange of Nonclinical Data (SEND) Implementation Guide for Animal Toxicology Studies* can be obtained from the CDISC Web site at: <http://www.cdisc.org/models/send/v2.3/SENDV2.3ImplementationGuide.pdf>.

3.4.3 欧州 SPIDIA 中間報告書（翻訳文）

第2回開発ワーキンググループ委員会の資料（平成24年1月12日）として、欧州 SPIDIA 中間報告書を翻訳して配付した。

「SPIDIA ニュースレター 2011 年 10 月号」“SPIDIA Newsletter 10/2011”（October, 2011）

SPIDIA ニュースレター 2011 年 10 月号

SPIDIA ホームページ(www.SPIDIA.eu)

SPIDIA のホームページには、私たちが参加する最新イベントのリストや SPIDIA のポスター及びプレゼンテーションのダウンロード、他の組織や関連主導機関へのリンクなど SPIDIA のプロジェクトに関するニュースを定期的に発信しています。そこでは、プロジェクトの背景や SPIDIA パートナーについてより多くの情報を得られます。質問やアイデアがあれば、“Contact Us”フォームを使って、私たちに連絡をくださることも可能です。お気軽にお訪ねください。www.SPIDIA.eu

目次

SPIDIA のプロジェクト進行状況

組織に基づく診断開発のための技術の進展

血液検体に基づく分子診断のプレアナリシス相をどのように改善し標準化するか

最初の検定品質バイオマーカー・セットの同定及び解析が完了した

ヒト血液検体の処理における統合ワークフローの開発

バイオマーカー開発計画におけるプレアナリシス・ツールの試験及びガイドライン

プレアナリシス・ワークフローを調和させるためのガイドラインの開発と今後の活動

2011 年 6 月 13-17 日にプラハで開催された qPCR シンポジウムで多数の SPIDIA ニュースが発表された

SPIDIA の倫理的、法的及び社会的なトピック

我々に会うには

SPIDIA ご案内

（本文）

SPIDIA とは

SPIDIA（Standardisation and improvement of generic pre-analytical tools and procedures for in vitro diagnostics）は、遺伝的プレアナリシス・ツール及び in vitro 診断手順の標準化及び改善に関する研究を行う、4 年間の大規模な総合研究プロジェクトである。SPIDIA の研究及び標準化に向けた活動は、エビデンスに基づくガイドラインの作成から、プレアナリシス相ツールの作成、検体品質バイオマーカーの新規アッセイ開発を通じたこれらのツールの試験と最適化に至るまで、すべてのステップに及んでいる。このコンソーシアムは、7 つの公的研究機関、8 つの研究企業及び公的なヨーロッパ規格機関によって立ち上げられた。SPIDIA の予算は 13,000,000 ポンドで、EC の寄与は 9,000,000 ポンドである。

SPIDIA の設立理由

in vitro 診断は、医療において著しい進歩をもたらした。核酸、たん白質、代謝産物のような細胞生体分子の解析のための新技術のさらなる進歩が期待されている。これまでの研究によって、これらの分子のプロファイルは、運搬及び保管の間に劇的に変化し得るため、診断あるいは薬学研究の信頼性を下げ、あるいは不可能にしてしまうことが示されている。したがって、さらなる進歩は、臨床検体の採取、取り扱い、安定化及び保管におけるガイドラインの欠如のために、また、新しい改良された検体技術がいまだ得られないために、限られたものになっている。SPIDIA プロジェクトは、ガイドライン、品質保証スキーム及び革新的プレアナリシス・ツールを提供することで、このギャップを埋めることを目的とする。これらはまた、バイオバンク作成及び生物医学的研究においても高い重要性を持つ可能性がある。

SPIDIA のアプローチ

SPIDIA は 3 つの活動のために組織されている。それぞれは、複数の作業パッケージで構成されている。最初の活動は、汎ヨーロッパ的品質保証スキーム及び in vitro 診断のプレアナリシス相ガイドラインを作成することである。このような文書は、プレアナリシス手順において問題のあるステップを明らかにするために行われる、リング・トライアルによって集められたエビデンスに基づいて作成される。これらの手順は、組織、腫瘍、全血、血清及び血漿検体から単離された、DNA、RNA、たん白質及び代謝産物ターゲットに特に焦点が当てられている。さらに、臨床及び生物学的検体の、人工的な採取後の変化を検出するための、検体品質保証バイオマーカーの発見を目指す。我々の二つ目の活動は、in vitro 診断のプレアナリシス相における脆弱なステップ及び相互関係を強化する躍進技術の発見、開発及び統合に費やされる。結果として、古典的分子診断との接続を目指している。この活動は、組織、血液及び綿棒検体のような非侵襲的検体の新奇な安定化技術を開発し、複数のプレアナリシス・ステップを自動化されたワークフローへと統合することを含む。最後に、我々の三つ目の活動は、管理、倫理及び優位性の普及に焦点を当てている。この活動は、開発とガイドラインについての情報を、臨床、科学及びバイオバンキングのコミュニティに普及させるため、トレーニングを実施することを目的とする。また、倫理的な配慮及びコンプライアンスをも保証する。

SPIDIA のプロジェクト進行状況

組織に基づく診断開発のための技術の進展

新しい固定及び安定化技術の評価

SPIDIA の最初の 3 年間で、新しい組織固定及び安定化技術が開発され、標準化されたプロトコルと生物医学的ツールによって、古典的な組織病理学的解析と、新興の分子解析とを併せて用いることが可能になった。異なるアルコールや酸が、生体分子を保存する多数の物質と組み合わせられ、1500 を超える異なる化合物と混合物を含む大規模なスクリーニング計画において特定された。最終的に開発された方法は、固定及び安定化試薬を連続して用いる 2 段階処理であり、最初に固定された組織を安定化試薬に移すと、少なくとも室温で 7 日間、2~8°C で 8 週間保存可能になる。この新しい組織保存技術は、PAXgene 組織システムと呼ばれた。

現行及び新奇組織保存技術の直接比較のため、組織採取は両者を組み合わせた方法で開始された。検体は液体窒素素中で新鮮なまま凍結されるか、ホルマリン及び PAXgene 組織システムで固定され、パラフィン包埋された。下流アプリケーションも含めて、次のパラメータが調べられた：形態、抗原性、たん白質、代謝産物、DNA 及び (mi) RNA。注目すべき利点は、PAXgene 組織システムで処理された組織検体における RNA 保存に関することである。参加した病理学部門（Department of Pathology, Josephine Nefkens Institute, Erasmus MC, Rotterdam (EMC); Institute of Pathology, Medical University of Graz (MUG); Institute of Pathology, Technical University Munich (TUM)）において、異

なる器官及び疾患に由来する 3500 を超える検体が採取され、ルーチンの臨床環境（例：温/冷虚血、組織サイズ、固定時間、保存条件）において検体品質を表す臨床的パラメータを反映させた、様々なプロトコルによって処理された。

新しい固定用試薬を用いた場合の組織の形態及び抗原性の保存性を、中性緩衝ホルマリンと比較において調べるための作業計画が実行された。PAXgene 組織システムを使った組織の HE 染色は、ホルマリン固定された組織に比べて形態的に同等、または核など詳細なレベルを伴うある範囲においてはより優れていることを示した。40 の異なる抗体を用いて抗原性の徹底的な試験が始まった。

試験に用いられた抗体の一部：

- ・ CD2, CD3, CD5, CD10
- ・ ER α , PR, Her2
- ・ サイトケラチン 5/6, サイトケラチン AE1/AE3, サイトケラチン 7
- ・ Ki67, S100, ビメンチン

現在のところ、試験に用いられたすべての抗体について免疫組織化学染色の結果が示され、それらは代表的な組成のホルマリンを用いた場合と同等である。ある場合には、抗原賦活化ステップの修正（例：異なる pH の賦活化緩衝液を用いる、あるいは抗原賦活化ステップを完全に取り除く）が必要だった。酵素による前処理は全く必要ない。結論として、新しい PAXgene 組織システムによって固定された組織は、HE 染色においてホルマリン固定に匹敵する形態を示すとともに、免疫組織化学においてよい抗原性を示したが、FFPE 組織のために開発された標準染色プロトコルには若干の修正が必要な場合がある。

核酸、形態及び抗原性の保存に関する、これらの包括的研究についての論文は現在準備中である。

さらに、異なるプロテオミクス解析への適合性を、Ergin et al. (J Proteome Res. 2010 Oct 1; 9(10): 5188-96)の論文によって示した。我々は、たんぱく質は分解されず免疫反応を保ち、もっとも重要なことに、たんぱく質のリン酸化のような翻訳後修飾が保たれていることを示すことができた。

組織採取の改善及び組織検体におけるブレアナリシス・ワークフローの標準化

組織採取/安定化及び運搬のワークフローをさらに完全なものにし、標準化するため、二つの新しい固定/安定化溶液を統合できる容器の原型を開発した。最初の原型容器は、もっとも好ましい設計コンセプト—固定試薬及び安定化試薬を入れる二つの溶液槽を持つ容器—に基づいて成形された（図 1）。溶液槽の容量は、組織片の固定/安定化に必要な固定液及び安定化液の体積に基づいて決められ、標準化された組織カセットに合うように設計された。組織カセットのホルダーは、容器の蓋に結合されているので、固定液から安定化液へと容易に移動できる。

図 1. “二つの溶液槽をひとつに含むコンセプト”に基づく原型容器

左：二つの溶液槽を伴う容器のコンセプト：蓋には標準化された組織カセットのホルダーが付いている。二つの容器にはそれぞれ、組織安定化技術における二つの安定化溶液のひとつが入れられる。

右：組み立てた組織用容器

表示コンセプト及び取り扱い説明書は、移動に関する安全性に言及しており、操作中に起こり得るヒューマン・エラーを最小限に留めている。この装置を用いた組織固定及び安定化のための標準化されたワークフローを確立した（図 2）。標準化におけるひとつの重要点は、標準化された組織カセットを用いるための組織サイズを決定したことである。もうひとつの重要点は、固定時間の枠組みを決定し、安定化液中の組織の異なる温度条件における最大

保存時間を評価したことである。組織は、25℃では7日間まで、2～8℃では4週間まで、組織形態あるいは核酸の安定性に対する悪影響がなく、安定であることが明らかになった。

図 2. 原型となる装置を用いた組織固定及び安定化において推奨されるワークフロー

1. 組織を切り出し、標準組織カセットに入れる
2. キャップ/ラック複合体をはずす
3. 組織カセットをラックにはめる
4. ラックを組織固定液を入れた溶液槽 1 に入れる
5. 2～4 時間固定
6. 固定後、組織カセットを溶液槽 1 から組織安定化液を入れた溶液槽 2 に移す
→安定化組織の処理と包埋
7. 分子及び病理学的解析を行う

組織材料に基づくメタボロミクス研究の課題への取り組み

組織に基づくメタボロミクス、プレアナリシスのワークフローを標準化するため、組織材料のメタボロミクス研究における、NMR 用に検体調製及びスペクトル取得の標準操作手順を確立し、虚血、保管及び保存技術などのプレアナリシス手順がメタボロームに及ぼす影響を調査した。

結論として、我々の研究は、プレアナリシスのパラメータが、組織の分子解析結果に大きな影響を与えることを示した。結局のところ、組織に基づく分子解析の質は、プレアナリシス手順の内容のみによって決まる。したがって、SPIDIA の作業パッケージによって得られた結果は、SPIDIA の標準化活動のための基本データをも提供するだろう。SPIDIA が始めた米国 National Cancer Institute (NCI) との共同研究では、PAXgene 組織システムは、NIH 一般研究基金計画 GTEx (遺伝子型組織発現 www.commonfund.nih.gov/gtex/) によって、検死における組織採取について評価された。評価は、組織形態の質が、少なくともホルマリン固定の場合に匹敵することを示し、コンソーシアムの中では今後 PAXgene 組織システムを使用することになった。このプロジェクトにおいては、1,000 体の死体提供者から多数の組織を採取することが計画されている。詳細については下記のサイトを参照のこと：

http://www.genome.gov/Pages/About/NACHGR/September2011AgendaDocs/NACHGR_Sep122011_GTExUpdate_Struewing.pdf

血液検体に基づく分子診断のプレアナリシス相をどのように改善し標準化するか

分子診断は医療の大きな進歩をもたらしたが、生物学的検体の採取、操作、安定化及び保存についてのガイドラインがないために、その使用は限られている。SPIDIA は、特に血液由来 DNA、血漿由来の、細胞を含まない DNA 及び血液由来 RNA に焦点を当てた、汎ヨーロッパ的外部品質保証スキーム (EQA) のための委員会を立ち上げることを予定している。血液及び血漿検体のための、エビデンスに基づく品質ガイドラインの開発には、プレアナリシス手順においてさらに改善を必要とする重要なステップの特定が必要である。

目標の達成に向けて、ヨーロッパにおけるプレアナリシス・ワークフローの現状を分析するため、SPIDIA はリング・トライアルを実施した。EFCC (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine、<http://www.efccim.eu/>) の援助を受け、全部で 322 の事例が、ヨーロッパ 30 国における 219 の研究室から集められた。

SPIDIA DNA 及び DNAPlas リング・トライアル

参加研究室はそれぞれ、血液または血漿検体を受け取り、当該研究室の標準 DNA 抽出手順を用いて、これらの検体から DNA を抽出した。抽出した DNA の分光光度測定のうち、研究室はこの検体を SPIDIA の研究室

(University of Florence) に送付した。そこで我々は、DNA 検体を再び分光光度測定し、さらにリアルタイム PCR を用いて、単一コピー遺伝子である RNase P の量を測定した。DNA 検体の完全性を評価するため、もうひとつの SPIDIA 研究室 (QIAGEN GmbH) ではパルスフィールド電気泳動による解析が行われた。血漿から抽出された DNA の完全性は、Isohelix 1 Quality Check キット及び Agilent 1 DNA キットを用いて解析された。さらなる DNA 品質パラメータとして、抽出 DNA 中の干渉の存在について、KineretTM Version 1.0.5 ソフトウェア (Labonnet Ltd.) を用いた速度論的解析が行われた。個々の検体の増幅されたデータが、定義された参照セットからの運動距離 (KD) を計算するために用いられた。

SPIDIA RNA リング・トライアル

DNA リング・トライアルと同様に、SPIDIA RNA リング・トライアルの目的は、調査後にガイドラインを定めるため、血液由来 RNA に基づく解析におけるプレアナリシスのワークフローの現状を明らかにし、その問題点を発見し、血液検体についてのワークフローを改善することだった。参加研究室はそれぞれ、K2EDTA 中または細胞由来 RNA プロファイル安定化溶液が入った PAXgene 血液 RNA チューブ中に、当該研究室の標準方法により採取された 2 つの血液検体を受け取った。彼らはこの血液から異なる時間ポイントに彼らの内部手順に従って RNA を抽出し、SPIDIA の研究室 (University of Florence) に送り返すよう依頼された。そこで RNA 検体は、事前に定義された以下のパラメータについて解析され、品質を評価された：純度、全量（分光光度測定）、完全性（Agilent 技術 RIN 評価）、GAPDH、IL1 β 、IL8 及び c-fos 遺伝子の転写レベル（qPCR）及び干渉基質の存在（Kineret ソフトウェア）。

データ解析及び次の段階

3 つのリング・トライアルすべてのデータは、エビデンスに基づくガイドラインの第一稿を作成するために、プレアナリシス変数（例：保管温度及び用いられた抽出法）と、核酸品質に関連するパラメータ（例：収率、純度あるいは完全性）とを関連付けて解析された。最後に、我々は得られたすべてのデータについて統計学的評価を行い、参加者のための最終報告書を作成した。これらの SPIDIA リング・トライアルの結果に基づき、我々は現在、エビデンスに基づくガイドラインの第一稿を作成中である。それは実験室でのパフォーマンス向上を試験するために計画された、リング・トライアルの第二セットを含む予定である。

告知：3 回の SPIDIA リング・トライアルの内、第二回は現在参加受付中である。<http://www.efccim.eu/spidia/>に、詳細情報と申込フォームがある。参加無料。申込締切りは 2011 年 10 月 30 日。

最初の検定品質バイオマーカー・セットの同定及び解析が完了した組織中の RNA 及びたん白質

SPIDIA の目標の一つは、臨床組織検体の処理において、多くのプレアナリシス因子のうち、たん白質バイオマーカーに最も影響するものを見つけることである。前号のニュースレター以降、SPIDIA パートナーは、最初の組織セットの解析を完了し、目的とする（逆相たん白質アレイ）及び目的ではない（タンデム質量分析）プロテオミクス法を適用して組織処理の間に変化するたん白質及びリンたん白質を同定した。これらのデータは現在、出版に向けた原稿作成のために準備されている。さらに、プレアナリシス相の RNA の安定性を解析するため、Affymetrix 1 チップ解析が行われた。制御された安定な RNA 遺伝子が同定され、それらは組織検体のプレアナリシス相を監視するために使用可能な RNA 品質バイオマーカーを同定するため、今後数カ月で検証される。

血液中の RNA

血液品質バイオマーカー・グループの第一の目的は、血液検体におけるプレアナリシス変数の影響を受ける RNA バイオマーカーを同定することである。我々はすでに、EDTA 血液検体及び安定化血液検体中の RNA のプレアナリシス変数を監視するためのバイオマーカー・セットを同定し、検証した。現在我々は、血液検体の大規模コホート研究におけるバイオマーカーの有効性のさらなる評価を計画している。さらに、バイオマーカーの数を増やすため、新しいマイクロアレイ研究から、さらなる候補が選択されており、今後数カ月の間に qPCR によって妥当性評価が行われる。

尿、血清、血漿及び組織のメタボロミクス

採取された新鮮な検体のプレアナリシス相においてもっとも大きく変化する低分子量の分子が同定された。この結果は、代謝産物を化学的コヒーレント・サブセットとして統合し、臨床/バイオバンク環境における組織管理中に生ずる望まない副作用の解釈を助けるために用いられ、信頼できる、妥当な調和された標準操作手順を決定するための情報を提供した。

ヒト血液検体の処理における統合ワークフローの開発

血液検体の処理における現在のワークフローは、*in vitro* 診断過程におけるプレアナリシス相と分析相とを明確に区別する。プレアナリシス系は通常、下流のアッセイのため、採取/運搬、保管及び目標生体分子の抽出を統合する。プレアナリシス相とアッセイをともに統合する系は使用可能ではなかった。SPIDIA 作業パッケージのひとつは、安定化された血液検体からの RNA 抽出の、低程度及び中程度の処理能力を実現する磁化ビーズ技術を用いた統合的ロボット・システムを開発すること目的としていた。さらに、解析のための検体採取の全過程を標準化するため、核酸に基づくアッセイの反応立ち上げをプレアナリシス・ワークフローへと統合する。すでに存在する QIASymphony SP ロボティック検体調製プラットフォームに基づき、QIAGEN は安定化血液検体から、miRNA を含む全 RNA を抽出する全自動プロトコルを開発した。当該ワークフローは、人の最低限の関与しか必要とせず、血液検体におけるプレアナリシス検体の操作をさらに標準化する。開発されたプロトコルは、安定化された血液検体の転写産物解析に使用する、miRNA を含む RNA の調整に用いられる。ワークフローの次の段階は、この RNA を用いた RT-PCR アッセイの立ち上げである。新しく開発された QIASymphony AS ロボティック・システムに基づき、QIAGEN は、単離された RNA に適用し、定量 RT-PCR 反応のための完全なマスターミックスを調製するための反応設定プロトコルを作成した。

バイオマーカー開発計画におけるプレアナリシス・ツールの試験及びガイドライン

もうひとつの SPIDIA 作業パッケージは、バイオマーカー発見計画における他の作業パッケージで標準化されたプレアナリシス・ツールと手順の適合性を示すことを目的としている。選択された事例は次のものを含む：i) 全血におけるアルツハイマー病の遺伝子発現の特徴の検証、ii) アルツハイマー病を、臨床的に共通部分がある他の認知症と区別する能力、iii) 結腸直腸がんにおいて使用可能な遺伝子、microRNA の発現及び代謝産物の特徴の同定。この枠組みの中で、デンマークの 3 つの病院における 155 人の転移性結腸直腸がん（mCRC）患者と、139 人の健康な人の血清メタボロームをプロファイリングするため、我々はプロトン核磁気共鳴（¹H-NMR）を用いた。我々

の結果は、¹H-NMRによるプロファイリングはmCRCの強力なメタボロミクスの特徴を確立する。mCRC患者に由来するメタボロミクスの特徴は、一般的な生存を予測するとともに、疾患の進行を予測し治療を個別化するために用いることができる、新しいバイオマーカーの潜在的可能性についての知見を提供する。

この研究のこれまでの結果は2本の論文として出版された：

Bernini P, Bertini I, Luchinat C, Nincheri P, Staderini S, Turano P. Standard operating procedures for pre-analytical handling of blood and urine for metabolomic studies and biobanks. *J Biomol NMR*. 2011 Apr; 49(3-4):231-43.

Bertini I, Cacciatore S, Jensen BV, Schou JV, Johansen JS, Kruhn M, Luchinat C, Nielsen DL, Turano P. Metabolomic NMR fingerprinting to identify and predict survival of patients with metastatic colorectal cancer. 投稿中

プレアナリシス・ワークフローを調和させるためのガイドラインの開発と今後の活動

異なる作業パッケージの進捗によって、SPIDIAはエビデンスに基づくガイドラインの開発を開始することが可能となった。SPIDIAパートナーのCEN（European Committee for Standardization in Brussels）は、プレアナリシス相のin vitro分子診断のために作成中の文書で用いるヨーロッパ標準を開発するため、初めての国際ワーキング・グループ会議を企画した。

SPIDIAはまた、European Research Infrastructure BBBMRI（Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure, www.bbmri.eu）のような診断部門外の組織とも協同している。

プレアナリシス・ワークフローを、ヨーロッパ以外の地域を含む、より広い国際水準で調和させる可能性をも評価するため、SPIDIAは、米国CLSI（Clinical and Laboratory Standards Institute, www.clsi.org）、米国OBBR（Office of Biorepositories and Biospecimen Research, www.biospecimens.cancer.gov）内のcaHUB（cancer Human Biobank）、そしてNIH一般基金計画GTEx（Genotype Tissue Expression, www.commonfund.nih.gov/gtex/）のようなBRN（Biospecimen Research Network）イニシアチブとも協同している。

2011年6月13-17日にプラハで開催されたqPCRシンポジウムで多数のSPIDIAニュースが発表された

2011年6月13-17日、チェコ共和国プラハにて、qPCRシンポジウム、“リアルタイムPCRの発展とプレアナリシスから分子診断まで”（<http://www.qpcrsymposium.eu/>）がSPIDIAパートナーであるTATAAによって開催された。このイベントは“SPIDIA：プレアナリシス相の標準化に向けて”を含むワークショップの一日から始まり、次の2日間はセミナー、さらにワークショップの2日間が続いた。セミナーは“腫瘍細胞の循環-CTC”及び“プレアナリティクスと標準化”という2つの大きな分野に分かれて開催され、後者にはSPIDIAコンソーシアムから数人が講演者として参加した。最後の2日間にはワークショップ“SPIDIA：検体調製と品質管理、血液検体”、“SPIDIA：検体調製と品質管理、組織及びその他の検体”及びコンソーシアムの講師による“SPIDIA：SPIDIA招待講演コース”が開催された。シンポジウムには世界中から250人が参加して大成功に終わり、講演者と聴衆の両者から高い評価を得た。

シンポジウムにおけるSPIDIAパートナーによる講演：

Uwe Oelmueller：遺伝的プレアナリシスのワークフロー：課題と解決

Mario Pazzagli：血液検体における分子的手法のプレアナリシス相

Christian Viertler：分子解析における組織プレアナリティクスの影響

Marcel Kap : バイオバンクの検体をどのように用いるか : 開発可能性と不可能性

Claudio Orlando : ヒトのがんにおいて変化するマイクロ RNA の発現 : 遺伝的及びエピジェネティック因子の影響

Ales Tichopad : qPCR による定量のエラー

Mikael Kubista : 単一細胞の発現プロファイリング

ワークショップ “SPIDIA : プレアナリシス相の標準化に向けて”

2011 年 6 月 13 日、qPCR シンポジウムにおいて、SPIDIA パートナーは DNA、DNAplasmids 及び RNA リング・トライアル（上記記事参照）に参加している研究室と会合を持った。SPIDIA の講演者は、参加研究室で用いられている主要な手順についての結果を示し、これら 3 つの SPIDIA リング・トライアルの目的、検体解析に用いられるプレアナリシス変数及びパラメータについて述べるとともに、最初のリング・トライアル及び検体解析に関する重要点について強調した。SPIDIA-RNA、DNA 及び DNAplasmids の配送箱の準備、参加研究室から返送された核酸検体の解析手順、及び Agilent RIN 評価と分光光度測定 of 標準操作手順の確立に関するすべての詳細が説明された。SPIDIA は研究室における改善を検証し、SPIDIA が最終的なエビデンスに基づくガイドラインを作成する助けとなる第二のリング・トライアルを参加者に提案した。

SPIDIA 倫理的、法的及び社会的なトピック

SPIDIA の作業パッケージは、SPIDIA プロジェクトにおける医療目的によるヒト材料の交換に関する規制及び倫理的トピックをも扱う。さらに、作業パッケージは参加する科学者に、ヒト材料を用いた研究周辺の異なる倫理的発展について認識させる。そこで、研究にヒト及び動物材料を用いる SPIDIA プロジェクトの参加者それぞれから 1 人ずつの代表者と、二人の国際的に優れた外部専門家、Ruth Chadwick (Cardiff University) and Anne Cambon-Thompson (INSERM)によって構成されるプロジェクト倫理委員会 (PEC) が立ち上げられた。

公的ローカル・ルールが守られているか監視するため、公的文書が印刷され、PEC に送付された。参加者間での検体の交換は、OECD-TuBaFrost Code of Conduct (www.tubafrost.org) に基づき行われる。次に、ヒト及び動物材料の研究使用についての一般への透明性を確保するため、PEC は SPIDIA の倫理的、法的及び社会的トピックについてのウェブ・ページを <http://www.spidia.eu> に作成した。

倫理的発展に対する科学者の認識を促すため、倫理についての内部ワークショップが、SPIDIA コンソーシアムにおいて、SPIDIA 年会のいくつかの機会に外部アドバイザーの専門家とともに開催された。一方、アンケートも実施され、SPIDIA プロジェクトの倫理に関係する文書が、動物実験に関する文書も含め、参加者から集められた。プラハにおける SPIDIA 年会では、“倫理発見討論 : あなたの隣人に会おう”と題された PEC ワークショップも開催された。このセッションにおいては、社会とのいくつかの特徴的な関係、バイオバンキング及び材料を使用する上での規制について討論された。それによって規制の問題は倫理の問題とは異なるということが、参加者の間で非常に明確となった。規制に従うことは義務だが、倫理に従うことはそうではない。しかし、例えば公の肯定的な姿勢に大きく貢献する透明性など、倫理は忘れられてはならない。こうした肯定的な姿勢は、この分野をより厳しく規制する必要はないという当局の見方を導くからである。

我々に会うには

SPIDIA パートナーは、さまざまな会議においてこのプロジェクトと結果について、定期的な発表を行っている。

過去のイベント

- ・ 2011 BRN シンポジウム：2011 年 3 月 28-29 日 ベテスダ、米国メリーランド州

口頭発表：

_Uwe Oelmüller：EU プロジェクト SPIDIA 最新情報 Δ 遺伝的プレアナリシス・ツール及び in vitro 診断手順の標準化及び改善

_Sibylle Güdtsch：プレアナリシスにおける変数がヒト組織検体のたん白質品質に及ぼす影響の調査

ポスター発表：

_Daniel Gröz：PAXgene 組織：形態及び核酸の同時保存のための新しい組織固定技術

<http://www.brnsymposium.com/>

- ・ 第 7 回 分子病理学及び（組織）細胞化学シンポジウム：2011 年 4 月 29-30 日 オロモウツ、チェコ共和国

口頭発表：

_Peter Riegman：形態及び分子診断における組織バンキング

http://lmp.upol.cz/workshop2011/abstrakta_patologie.pdf

- ・ ISBER 2011 年 年会及び展示：2011 年 5 月 15-18 日 アーリントン、米国バージニア州

口頭発表：

_Marcel Kap：ルーチン病理学における PAXgene 組織システム：病理学的アーカイブに対するバイオバンキングの機会の増加

<http://www.isber.org/mtgs/2011/>

- ・ IFCC-世界ラボ・ミーティング：2011 年 5 月 15-19 日 ベルリン、ドイツ

口頭発表：

_Uwe Oelmüller：EU プロジェクト SPIDIA Δ 遺伝的プレアナリシス・ツール及び in vitro 診断手順の標準化及び改善

_Kurt Zatloukal：プレアナリシスにおけるパラメータが組織に基づくバイオマーカーへ及ぼす影響

_Mario Pazzagli：血液検体のプレアナリシス相に関するエビデンスに基づく品質ガイドライン

<http://www.berlin2011.org/>

- ・ TIDES カンファレンス 2011：2011 年 5 月 22-25 日 ボストン、米国マサチューセッツ州

口頭発表：

_Uwe Oelmüller：ヒト検体における遺伝的プレアナリシス・ワークフローの標準化と改善

<http://www.ibclifesciences.com/TIDES/overview.xml>

- ・ ドイツ病理学会（DGP）2011 年 年会：2011 年 6 月 16-19 日 ライプツィヒ、ドイツ

口頭発表：

_Sibylle Güdtsch：プロテオミクス解析のための PAXgene 固定、パラフィン包埋組織の評価

<http://www.pathologen-kongress.de/>

- ・ 第 23 回ヨーロッパ病理学会議（ECP2011）：2011 年 8 月 27 日-9 月 1 日 ヘルシンキ、フィンランド

ポスター発表

_Christian Viertler : 組織中の生体分子及び形態の同時保存のための新技術

_Marcel Kap : ルーチン病理学における PAXgene 組織システムの使用

_Sibylle Güdich : 固定の遅れが臨床組織検体におけるたん白質プロファイルに及ぼす影響

<http://www.esp-congress.org/>

・ MipTec カンファレンス 2011 : 2011 年 9 月 19-22 日 バーゼル、スイス

口頭発表 :

_Uwe Oelmüller : プレアナリシス検体処理に関する SPIDIA コンソーシアム

<http://www.miptec.ch/>

・ 逆相たん白質アレイ世界ワークショップ : 2011 年 10 月 10-11 日 ヒューストン、米国テキサス州

ポスター発表 :

_Sibylle Güdich : 固定の遅れが臨床組織検体におけるたん白質プロファイルに及ぼす影響

_Sibylle Güdich : 新奇固定剤が同一臨床組織検体による形態及び分子解析を可能にする

<http://www.mdanderson.org/education-and-research/education-and-training/schools-and-programs/cme-conference-management/conferences/cme/conference-management-reverse-phase-protein-array-global-workshop.html>

・ 第 53 回 組織化学学会シンポジウム : 2011 年 10 月 12-15 日 ミュンヘン、ドイツ

口頭発表 :

_Sibylle Güdich : 形態及び分子解析のための PAXgene 固定、パラフィン包埋組織の評価

<http://www.helmholtz-muenchen.de/histochemistry2011>

今後のイベント

・ ESBB カンファレンス : 2011 年 11 月 16-19 日 マルセイユ、フランス

口頭発表 :

_Uwe Oelmüller : EU プロジェクト SPIDIA ムー一般的プレアナリシス・ツール及び手順の標準化と改善

<http://www.esbb.org/nov2011/>

図 3. SPIDIA パートナー、オランダ・ロッテルダムで 2011 年 4 月に開催された前回の SPIDIA 会議にて

奥付 : SPIDIA, QIAGEN GmbH - QIAGEN ストラッセ 1-40724 ヒルデン、ドイツ

商標 : Kineret™ (Labonnet Ltd.); Agilent 4 (Agilent Corporation); Isohelix 1 (Cell Projects Ltd.); Affymetrix 4 (Affymetrix Inc.)

3.5 DNAチップに関する実証試験

3.5.1 実験目的

205 個のエストロゲン活性評価用遺伝子を用いて、化学物質のエストロゲン活性評価用オリゴ DNA チップを作製し、Cy3 を用いたオリゴ DNA チップアッセイの再現性および安定性を測定することにより、エストロゲン活性アッセイシステムを構築した。このアッセイシステムを利用して、リグナン類化合物（sesamin、enterodiols、enterolactone、matairesinol、pinoresinol、lariciresinol、isolariciresinol、secoisolariciresinol）のエストロゲン活性を評価した。

3.5.2 実験方法

3.5.2 (1) 実験方法の概要

本実験では、150 個のエストロゲン活性評価用遺伝子を用いて、8 種類のリグナン類化合物のエストロゲン活性を評価した。この遺伝子セットは、エストロゲン類、フェノール誘導体、フタル酸エステル、パラベンや天然物由来の疎抽出物や有効成分などの解析、さらにはラット脳の遺伝子解析に用いられており、cDNA チップとして十分な検証を行ったものである（文献 1-11）。

3.5.2 (2) 実験方法の説明

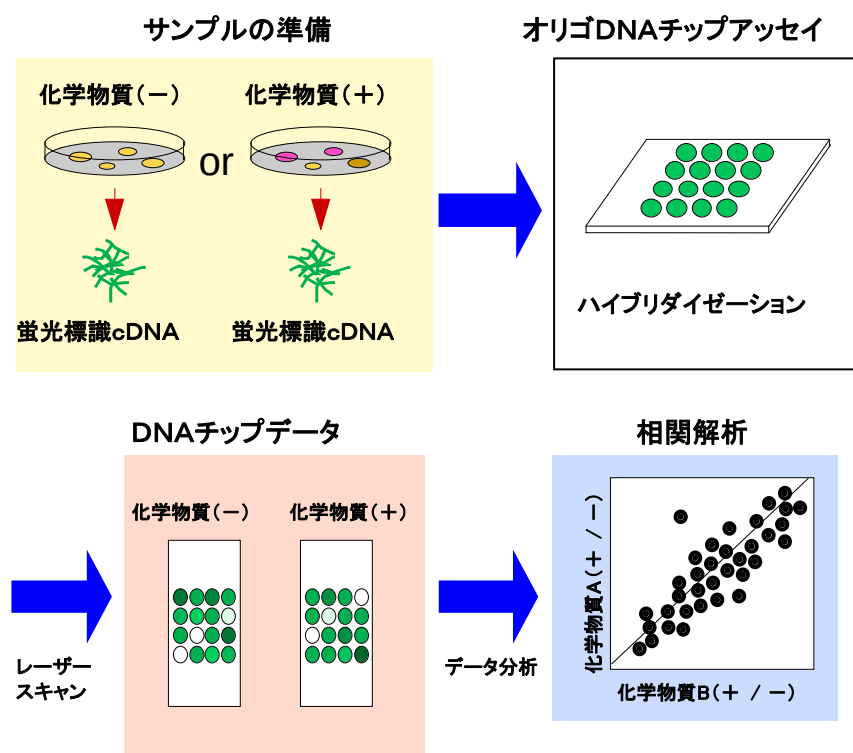


図 1. 実験方法。化学物質で処理なし（化学物質（－））あるいは処理した（化学物質（＋））細胞から、total RNAを抽出した。抽出したRNAからcDNAを合成し、蛍光色素で標識した後、オリゴDNA マイクロアレイに対してハイブリダイゼーションを行う。DNAチップ上のスポットの蛍光強度をレーザースキャナーにより計測し、測定されたデータはマイクロソフトエクセルを用いて分析した。各スポットについて、化学物質（＋）と化学物質（－）の蛍光強度の比率を計算し、この比率を 28 個のコントロール遺伝子の値で補正して、 $\log_2$ 値に変換した。化学物質AとBとの間の相関により化学物質の影響を評価する。

(a) トータル RNA の抽出

活性炭で処理した培地で三日間培養したヒト乳癌細胞 MCF-7 にエストロゲン (17β -estradiol, E2) 10 nM を加えて、さらに三日間培養した後、細胞を回収し、QIAGEN の RNeasy Plus Mini キットを使用して、細胞からトータル RNA を抽出した。DMSO で処理した細胞をコントロールとして用いた。

(b) mRNA の増幅

ジーンアレイのハイブリダイゼーションには多量の RNA が必要となる。そこで、ナノグラム単位の微量なトータル RNA 抽出サンプルからマイクログラム単位 (DNA チップを用いた発現解析に必要な量) のアンチセンス RNA (aRNA) を増幅する必要がある。

(a) で抽出したトータル RNA を用い、インビトロジェン社 SuperScript RNA Amplification System を使用して、mRNA の増幅を行った。

(c) cDNA の合成および蛍光標識

(b) で増幅した RNA を用いて、インビトロジェン社 SuperScript Indirect cDNA Labeling System を使用して、cDNA を合成し、さらに、Cy3 で cDNA を標識した。標識された cDNA を精製した後、12 μ l の TE バッファーに溶解した。

(d) DNA チップアッセイ及びデータ分析

上記 (c) の標識法で調製した標識 cDNA を DNA チップに載せて、65°C で一晩ハイブリダイゼーションさせた後、蛍光スキャナー FLA-8000 (FujiFilm) を用いて各スポットの蛍光強度を測定した。

測定されたデータはマイクロソフトエクセルを用いて分析した。まず、各スポットについて化学物質処理したときの蛍光強度と処理しないときの蛍光強度の比を求め、この比率を 28 個のコントロール遺伝子の値で補正して、 $\log_2$ 値に変換した。

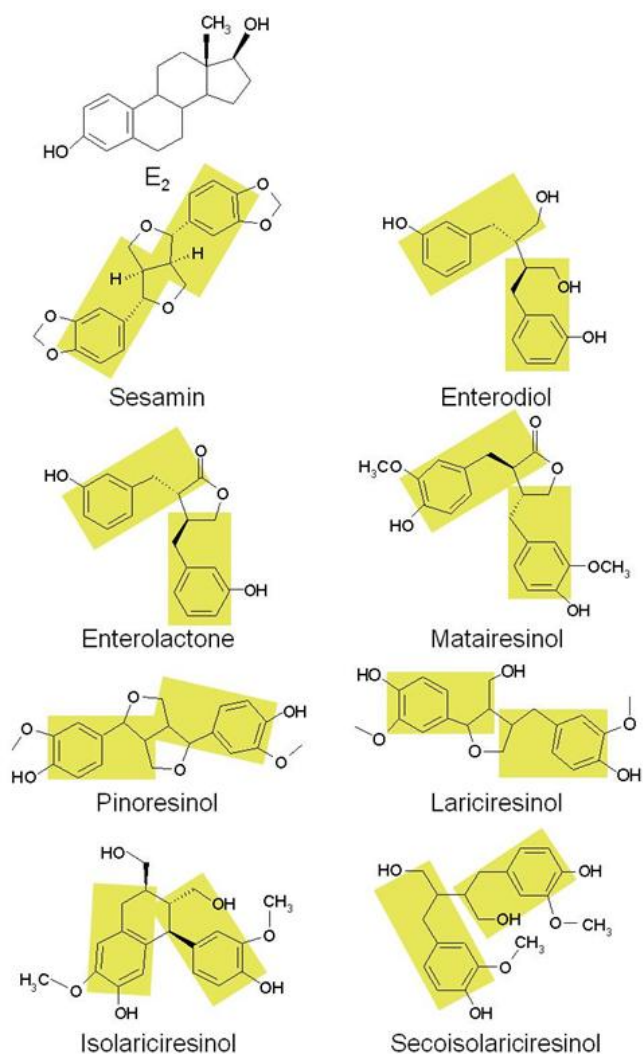


図2 化合物の構造図。フェニルプロピノイド構造を示した。

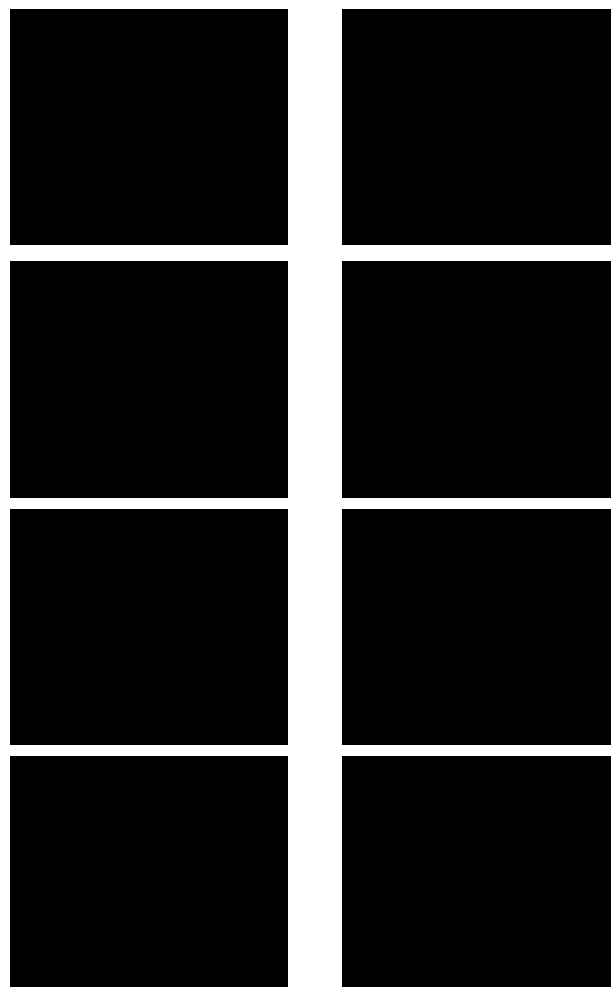


図3 各リグナン類化合物のDNAマイクロアレイアッセイの結果とエストロゲンの結果の間の遺伝子発現プロファイルの相関解析。150個のエストロゲン反応遺伝子を用いて、解析を行った。縦軸と横軸はシグナルの蛍光強度を $\log_2$ 値で示している。

3.5.3 実験結果及び考察

今回の実験で評価したリグナン類の中に、enterodiol、enterolactone、matairesinol、pinoresinol、lariciresinol、isolariciresinol、secoisolariciresinolはエストロゲンと高い相関性が見られた(相関係数0.70~0.79)。(図2、図3参照)。

これらの結果から、このマイクロアレイアッセイシステムを利用して、高い安定性と信頼性のデータを得ることができると考えられる。今後、このオリゴDNAチップアッセイシステムを用いて、多くの化学物質のエストロゲン活性を解析し、評価することができる。

3.5.4 参考文献

1. Inoue, A., Yoshida, N., Omoto, Y., Oguchi, S., Yamori, T., Kiyama, R. and Hayashi, S. (2002) Development of cDNA microarray for expression profiling of estrogen-responsive genes. *J. Mol. Endocrinol.* 29, 175-192.
2. Terasaka, S., Aita, Y., Inoue, A., Hayashi, S., Nishigaki, M., Aoyagi K., Sasaki, H., Wada-Kiyama, Y., Sakuma, Y., Akaba, S., Tanaka, J., Sone, H., Yonemoto, J., Tanji, M. and Kiyama, R. (2004) Expression profiling of the estrogen responsive genes for evaluation of estrogen activity among natural estrogens and industrial chemicals using a customized DNA microarray. *Environ. Health Persp.* 112, 773-781.
3. Ise, R., Han, D., Takahashi, Y., Terasaka, S., Inoue, A., Tanji, M. and Kiyama, R. (2005) Expression Profiling of the Estrogen Responsive Genes in Response to Phytoestrogens Using a Customized DNA Microarray. *FEBS Lett.* 579, 1732-1740.
4. Terasaka, S., Inoue, A., Tanji, M. and Kiyama, R. (2006) Expression profiling of estrogen-responsive genes in breast cancer cells treated with alkylphenols, chlorinated phenols, parabens, or bis- and benzoylphenols for evaluation of estrogenic activity. *Toxicol. Lett.* 163, 130-141.
5. Dong, S., Inoue, A., Zhu, Y., Tanji, M. and Kiyama, R. (2007) Activation of rapid signaling pathways and the subsequent transcriptional regulation for the proliferation of breast cancer MCF-7 cells by the treatment with an extract of glycyrrhiza glabra root. *Food Chem. Toxicol.* 45, 2470-2478.
6. Parveen M, Inoue A, Ise R, Tanji, M. and Kiyama, R. (2008) Evaluation of estrogenic activity of phthalate esters by gene expression profiling using a focused microarray (EstrArray). *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1416-1425.
7. Parveen, M., Zhu Y. and Kiyama, R. (2009) Expression profiling of the genes responding to zearalenone and its analogues using estrogen-responsive genes. *FEBS Letters* 583, 2377-2384.
8. Dong, S. and Kiyama, R. (2009) Characterization of estrogenic activity of ginsenosides in MCF-7 cells using a customized DNA microarray. *Food Chem.* 113, 672-678.
9. Xu, Q., Hamada, T., Kiyama, R., Sakuma, Y. and Wada-Kiyama, Y. (2008) Site-specific regulation of gene expression by estrogen in the hypothalamus of adult female rats. *Neurosci. Letts.* 436, 35-39.
10. Zhu, Y., Ogaeri, O., Suzuki, J.-i., Dong, S., Aoyagi, T., Mizuki, K., Takasugi, M., Isobe, S.-i. and Kiyama, R. (2011) Application of Fluolid-Orange-labeled probes for DNA microarray and immunological assays. *Biotechnol. Letts.*, 33, 1759-1766.
11. Dong, S., Furutani, Y., Suto, Y., Furutani, M., Zhu, Y., Yoneyama, M., Kato, T., Itabe, H., Nishikawa, T., Tomimatsu, H., Tanaka, T., Kasanuki, H., Masaki, T., Kiyama, R. and Matsuoka, M. (2012) Estrogen-like activity and dual roles in cell signaling of an *Agaricus blazei* Murrill mycelia-dikaryon extract. *Microbiol. Res.* 167, 231-237

4. ガイドラインの検討結果

遺伝子発現解析用 DNA チップ [改訂版] 開発ガイドライン 2011 (案)

1. 概要

1.1 遺伝子発現解析用 DNA チップ

DNA チップは、基板の上に特定の塩基配列を持った DNA を高密度に配置し、固定したものである。この DNA をプローブとして、検体標品を精製・標識など前処理したのものに対して反応させ、その反応物をレーザー光や電氣的・化学的検出法によって高感度に検出する。これによって多数の遺伝子や多型 DNA について網羅的な解析を可能にするものである。遺伝子発現解析用 DNA チップは遺伝子発現をもとに遺伝子の機能状態についての網羅的な解析を目的としたものであり、その解析対象は遺伝子型解析の対象であるゲノム DNA などとは異なり、主に RNA、もしくは、それを調製した試料である。

1.2 本ガイドラインの目的と範囲

DNA チップは、近年の技術的進歩によって、基礎研究用のみならず、あらゆる疾患の検査・診断や各種薬剤感受性の検査などに利用されるようになってきており、新たなジャンルの次世代医療機器として期待されている。一方で、DNA チップは信頼性や再現性、標準化など臨床現場に広く導入するにはまだ問題も多い。これらの問題点を解決し、医療機器として DNA チップの開発意欲を向上させ、DNA チップ及び関連機器の開発を促進し活性化することを目的に、まず遺伝子型（ジェノタイピング）検定用 DNA チップについて「テラーメイド医療用診断機器（DNA チップ）開発ガイドライン 2007」を策定し、公表した（平成 19 年 5 月、経済産業省）。今回は、遺伝子発現解析用 DNA チップに焦点をあて、医療機器としての遺伝子発現解析用 DNA チップ及び関連機器の開発の促進・活性化を目的に、その指標となるためのガイドラインを策定する。

遺伝子発現解析用 DNA チップによる検査・診断への応用としては、疾患の早期発見・早期診断、客観的疾患分類・確定診断、治療法選択、病状変化把握や治療効果モニタリングなどが考えられる。臨床検査や診断などの実臨床で DNA チップを用いる場合、得られるデータの高い信頼性や再現性が重要であり、判定ミスや判定の曖昧さを極力排除しなければならない。特に遺伝子発現解析用 DNA チップの解析対象である RNA は不安定な物質であるため、検体の保管・運搬及び前処理を含めた取り扱いにおける質保証、さらに再現性や信頼性の確保など様々な問題点がある。この点については後に項目別に述べる。

DNA チップは専用の測定装置とともに使用され、複数遺伝子の測定値をアルゴリズムに基づいて解析し、医療情報として提供する。DNA チップおよび関連装置の開発の促進には、高性能な測定装置の開発だけでなく、データの互換性や精度や再現性の向上のための標準化も必要であり、またチップや装置の評価法についても指針が必要と思われる。そこで、本ガイドラインではチップを含めた測定装置、その評価方法、標準化と大きく 3 つの項目にわけて記述する。

なお、本ガイドラインは、DNA チップの研究・開発を円滑に進めるうえで有用と考えられる事項を掲げたものであり、製品化に当たって、これらの事項のすべてが必要となるとは限らず、また、これら以外の事項が必要となる可能性があることに留意すること。

1.3 検査対象とリスク

検査対象は、血液、生検組織、手術採取標品、病理検査用パラフィン包埋標品などが考えられる。特に生材料の採取にはその迅速性、適切な保存処理がその後の解析に決定的な影響を与えると考えられ、そのプロトコルの標準化が重要な問題である。得られた測定結果は疾患の診断、治療法選択、病状経過や薬剤効果のモニターなどの参考となる。また、検体の採取には侵襲を伴うため、その負担とリスクを軽減する工夫や事故の補償に配慮すべきである。RNA が解析対象であってもそこから一部のゲノム情報も得ることができるため、遺伝子型解析と同様に個人情報保護に注意する必要がある。

1.4 先行事例

遺伝子発現解析用 DNA チップの臨床応用がすでに始まっている例として、国外で開発された乳がんの治療法選択に用いられる MammaPrint があり、本邦でも保険適用外ではあるが一部医療機関で用いられつつある。また、DNA チップとは異なるが、同様に乳がんの治療法の選択の際の指標として、RNA を対象とした複数遺伝子の発現解析診断キットとして RT-PCR 法を基礎とした製品 Oncotype DX が実用化されている。

1.5 測定システム

遺伝子発現解析用 DNA チップと装置は、開発メーカーが意図した性能を確保するために、遺伝子発現解析用測定システムとして一体化したものとして扱うことが必要であろう。DNA チップの性能は、これを解析する装置と組み合わせられて規定される必要があることから、DNA チップとこれを解析する装置は、一体化した状態での性能を規定し、その信頼性を評価するかたちが求められる。

2. 測定装置(チップと装置)

2.1 原理と構造

(1) 遺伝子発現解析用 DNA チップの検出原理

RNA の検出方式、装置で検出する出力信号を生み出す機構について詳細に検討する。

(2) チップと装置の構造

基板やプローブ DNA などチップを構成する主要素の仕様や形状・サイズ・構造などについて検討すること。特にプローブ DNA に関しては、 T_m (melting temperature) 値、GC (グアニン・シトシン) 比、配列の特異性や長さなど、プローブ設計の要件について検討すること。また、PNA や LNA などの人工核酸を用いる場合はその化学的性質についても検討すること。また装置

に関しては、装置本体の構成、装置を構成する各構成要素の仕様、機能の概略などについて検討すること。

2.2 方法

(1) 検出の概要

プロトコル、即ち検体の準備から、検出・判定に至る全工程の流れ、特に RNA 抽出・RNA 増幅・標識等のチップ・装置に導入する前工程、チップ・装置へのセッティング、装置での処理手順（処理条件）、信号から判定を導く工程等について技術的に詳細に検討すること。装置での処理は、マニュアル操作と自動操作の区別も明記し、操作におけるリスクについても評価すること。

(2) 装置の機能

信号検出特性に影響を与える可能性の高い温度制御機構、試薬送液機構、測定系、機械動作機構などは、各機構の動作、性能、役割を技術的に評価すること。また標準物質を用いて測定装置の評価や基準光源などの基準信号源による測定装置自体の校正を行うことが望ましい。

2.3 特異性、感度・ダイナミックレンジ、再現性等について

(1) 特異性

他の手法の解析により配列や濃度が既知である試料を用いて、実験的に DNA チップの特異性を検討すること。実験での評価が困難な場合は、DNA プローブの選定プロセスを詳細に説明すること。また、目的遺伝子以外と交差反応する可能性がある場合は、そのリスクについても検討すること。

(2) 感度・ダイナミックレンジ

標準検体、標準物質などを用いて、検出系の検出限界濃度やダイナミックレンジを検討すること。この際、使用した DNA チップと検出装置、反応プロトコル、検出条件などを明記すること。

(3) 再現性

DNA チップ、および検査システムによって得られるデータの再現性は十分に検証すること。再現性試験は、以下の項目について行うこと。

- ・有意な再現性を統計学的に判断するため、同一と見なされる試料に対し、少なくとも3つ以上の測定データを得ること
- ・検体は、複数の施設から収集すること
- ・再現性試験で使用される手順が、製品化時に示される手順と同様であること
- ・複数の製品ロットを使用すること

(4) 検査の品質管理

適切な陽性対照、陰性対照を設け、各種対照の意義、それらの結果がもたらす管理項目について技術的に検討すること。また、検査機器の設定条件に対するモニタリング方法及びフィードバ

ック方法を検討し、所定の条件で検査が実施されていることをどのように管理されているか説明すること。各コントロール、モニタリング、フィードバックにより得られる情報から、異常データとその管理方法を想定すること。

(5) その他、性能特性に影響する要因

DNA チップを含めた測定における交差汚染には、別検体・別試料の混入の二者があり得るが、それぞれの予防に対してとるべき操作環境・設備・手順について技術的に検討し、また、交差汚染を評価するための試験を実施しその結果を残すこと。

検体に含まれる潜在的な干渉物質は、必ずしも試料の調製によって除去できるとは限らず、試料の調製、または DNA チップでの検出に干渉する場合もある。したがって、干渉物質が検出性能に及ぼす影響について特性評価をすること。なお検査中の各種条件について、その設定根拠、特に RNA の定量に対する安定性について検討すること。

2.4 必要とするサンプル・検体、その前処理・保存法、試薬等について

(1) 検体

検体の品質が RNA の品質や RNA 増幅・標識に大きく影響するため、RNA を得る検体の種類（例えば血液、組織）およびその採取方法、採取量について検討すること。また検体の管理・保管方法については検討すること。

(2) 検体の前処理

検体から RNA を抽出・精製する方法について検討すること。また RNA の分解を防ぐための留意点を記すとともに、使用する RNA の品質の評価法について明記して、測定結果を保証できる RNA の品質基準を設定すること。なお RNA をなんらかの増幅法で増幅した上で用いる場合には、その増幅法と使用する試薬について検討すること。増幅した RNA を標識した上で後段の反応に使用する場合には、その処理法と使用する試薬について検討すること。

(3) サンプルの保存法

検体、精製 RNA、増幅 RNA、標識 RNA、といったすべての段階のサンプルについて、保管法及び輸送法について検討すること。すなわち、保管・輸送に適した温度と性能を維持できる期間について明記すること。

(4) 試薬

RNA の抽出・検査など各工程で使用する試薬について、その種類・濃度などに関して検討すること。試薬を DNA チップと共に提供する場合、再現性、精度等に対する試薬の影響について、プロセスの各段階で検証した結果を残すこと。試薬を DNA チップと共に提供しない場合には、DNA チップ使用者が適切な試薬を選択できるよう、必要な試薬の仕様および RNA の品質と量を評価するための方法・仕様を技術的に検討すること。

(5) 試薬の保存性・安全性

各工程の反応に使用される試薬の保管法・輸送法についても検討すること。また各工程で使用する試薬の安全性、および安全な取り扱いに必要な注意事項を検討すること。

(6) 自動操作

サンプル調製に関して人為的要因による差異、施設間の差異を回避するために、自動化の導入が考えられる。自動化する際は、分注精度、温度制御精度を明記すること、試料間の交差汚染を防御できる構造、機構であること、環境からの汚染、例えば、空气中に浮遊している反応阻害物質、RNA 分解酵素等の汚染物質の混入を防止できる構造であること、トレーサビリティを確保可能な機構であること、人的過誤を回避するための工夫が施され、作業への安全性が確保できること等を考慮すること。また、自動化が導入された場合も、その結果の再現性等、妥当性を確認すること。

2.5 ソフトウェア

(1) 装置を構成するソフトウェアの概要

装置のソフトウェア構成、その機能、関係性について技術的に検討すること。その際、ユーザが直接操作する部分、機器を制御する部分、データの解析を行う部分、データの管理を行う部分等について、項目に分けて文書化されていること。特にデータの処理、解析ソフトウェアについては、詳細を記した説明書を作成すること。また、更にはユーザが操作ミスをした場合の動作、機器に異常が発生した場合の動作、停電発生時・停電復帰時の動作等、正規の操作・動作以外の状況発生時の対応についても検討すること。ソフトウェアの開発・設計に関しては国際規格（例えば IEC 62304:2006）などを参照すること。

(2) 判定アルゴリズム

判定アルゴリズムについて、少なくとも判定に用いるプローブ DNA の種類、各プローブの重複数、判定に用いる測定値の定義、各プローブの測定値から判定を行うためのアルゴリズム、判定に必要な基準値の定義とその設定における統計学的な根拠、最終的な判定結果とその信頼度が十分な詳しさを文書化されていること。

2.6 データ処理

本装置を用いて取得したデータについてデータを保護するための手順が確立され、トレーサビリティの観点から、検査日時、検体 ID、DNA チップ及び試薬ロット、検査プロトコル、測定装置の対応が付けられるようにデータ管理されていること。

2.7 品質管理

(1) DNA チップ

保存方法、保存期間、安定性など、DNA チップの品質に関わる基本情報、チップに固定するプローブ DNA の品質管理について検討すること。特に DNA チップの品質管理に関連しては、

ISO/DIS16578 規格名称「マイクロアレイを用いた特定核酸配列の検出に関する一般的定義と要求事項」や GMP/QMS (ISO13485) などの製造管理/品質管理体制を検討すること。

(2) 検査装置

装置の校正方法、校正（検査）頻度、校正に用いる標準物質、合格規格、交換部品など、検査装置の品質に関わる基本情報、検査装置の品質管理に関連した GMP/QMS (ISO13485) などの製造管理/品質管理体制に関して、検討すること。

3. 評価法

3.1 評価項目

当該 DNA チップの評価法としては、以下の項目を含むこと。

- (1) 他の発現解析手法との比較
- (2) データ解析、解析ソフト
- (3) 妥当性の確認
- (4) 臨床性能試験
- (5) 判定アルゴリズム
- (6) データ管理
- (7) 安全性

3.2 他の発現解析手法との比較

DNA チップの評価にあたっては、他の遺伝子発現の解析法と比較検討すること。比較は診断上重要な遺伝子について重要性を言及した後、当該遺伝子を対象に、少なくとも 1 種類の同一と見なされる RNA を鋳型にして定量する方法により行い、両者の一致率を遺伝子ごとに検討すること。遺伝子定量法としては、当該プラットフォーム以外の一般的な手法、もしくは性能が確認されている既承認の他の DNA チップ等を用いることができる。

3.3 データ解析、解析ソフト

解析ソフトについては、用途に対して十分であることを適切に妥当性が検討され、同一データから同一の結果が得られること。その再現性を保証するためには、アルゴリズムを明確に表現すること。具体的には正規化の手法、データ補正の方法、マーカー遺伝子の抽出方法、判定の方法などを数式等で表し、数値化したデータに基づき判定されること。

3.4 妥当性の確認

妥当性の検討にあたっては、各方法の良否の確定に用いる手法は、コスト、リスクおよび技術的可能性のバランスを十分に検討し、次の事項のうちの一つ、またはそれらの組合せであり、客観的な結果を残すこと。

- ・他の解析法で得られた結果との比較

- ・ 試験所間比較
- ・ 結果に影響する要因の系統的な評価
- ・ 方法の原理の科学的理解および実際の経験に基づいた有意性の評価

また失敗事例（判定不能、器具の故障、試薬の不具合等に起因するもの）に関しても分析すること。

3.5 臨床性能試験

本項目については、平成 24 年 11 月 20 日付薬食機発 1120 第 5 号通知別添 2「RNA プロファイリングに基づく診断装置の評価指標」を参照のこと。

3.6 判定アルゴリズム

本項目については、平成 24 年 11 月 20 日付薬食機発 1120 第 5 号通知別添 2「RNA プロファイリングに基づく診断装置の評価指標」を参照のこと。

3.7 データの管理

原則として試料の種類、試料数、試料の調製法あるいは起源、試料の使用目的（特異性など）の記録を残すこと。最終的な結果の出力だけではなく、結果出力前の画像ファイルや数値データ等を保存すること。なお信号の検出・分析、データ保存については、プライバシーとセキュリティを十分に確保すること。また結果に疑問が生じた場合には、データ処理段階毎に確認が可能となること。

3.8 安全性

交差汚染を評価するための試験を実施して結果を残すとともに、判定に失敗した場合、あるいは判定結果の解釈に失敗した場合のリスクも評価し、その際に用いたリスク分析手法についても検討すること。

4. 標準物質

4.1 目的

遺伝子発現解析用 DNA チップ開発の各フェーズに応じて標準物質に求められる要件を示し、該開発品を用いた遺伝子発現解析データなどの信頼性を向上させることを目的とする。

4.2 標準物質に求められる要件

DNA チップ開発に用いられる標準物質には、特性の異なる様々なアレイ技術の精密性評価・正確性評価・結果表示のためのアルゴリズム検討に用いるもの（測定対象標品）や、当該開発品製造時の品質管理やルーチン検査における精度管理に用いるもの（精度管理用標準物質）がある。また、これらには測定結果のトレーサビリティの確認にも適用可能な性能が求められる。従って該開発品製造における標準物質の選定に当たっては以下の方法論的課題を考慮すべきである。

4.2.1 標準物質の選定

(1) 測定対象標品の選定

当該開発品が検出対象とする遺伝子と遺伝子発現量の相対比較に使用される塩基配列を含むサンプルによる評価が求められる。これらの被検対象への値付けや当該開発品の校正を行うため、測定対象標品には対象遺伝子を含む複数のヒトRNAサンプルや遺伝子発現量の相対比較に使用される内在遺伝子や人工的な対照塩基配列を含むサンプルを使用することを推奨する。また、測定対象と同じ塩基配列を有する上位の標準物質（認証標準物質など）を用いて被検対象の値付けをすることによって、測定結果のトレーサビリティを確認することもできる。

(2) 精度管理用標準物質の選定

解析対象の特定遺伝子を検出できることが開発の過程で確かめられている当該開発品を市販のために製造する場合、当該開発品が正確な指示値を示すよう調整するために精度管理用標準物質を使用する。精度管理用標準物質には対象遺伝子や人工的な非遺伝子塩基配列のうち、ヒト染色体遺伝子よりも安定性に優れ、増産が可能である合成RNAやcDNA 或いはその鋳型となるプラスミドDNA が適用され、当該開発品の性能評価が可能な部分の遺伝子配列或いは任意の非遺伝子塩基配列が含まれていれば良い。全塩基配列長等の仕様は被評価対象開発品の特性に合わせて開発者により決定されて差し支えないが、統一された測定条件（細胞溶解用緩衝液、プロテアーゼ、制限酵素等、抽出試薬に関する品質管理方法及びRNAの標準処理手順マニュアル）が設定されるべきである。

4.2.2 標準物質の管理

(1) 品質管理

標準物質は選定時に DNA シークエンシング等の方法によって配列を確認すること。標準物質を酵素合成等によって複製する場合は、複製ロット毎に遺伝子配列の確認を行うことによって相同性を担保する。また、電気泳動やHPLCなどを用いた塩基鎖長評価を行うことで、宿主由来塩基配列の混入や目的とする塩基配列の純度を確認する。精度管理用標準物質は酵素合成法による複製を経て使用されるが、複製を行う場合には適切な頻度で遺伝子配列が確認されなければならない。

(2) 純度

複製の鋳型などに用いる DNA の合成については、ホスホロアミダイト法等の一般的な方法を行い、目的とした遺伝子配列が合成されていることを DNA シークエンシング法、質量分析（TOF-MS）、HPLCや電気泳動法によって確認する。

(3) 濃度単位

標準物質を感度試験に用いる場合には、核酸定量法によって求められた既知濃度の標準物質を用いて希釈検体を作製し、検出感度の検定を行う。なお、核酸定量は吸光度法（OD260）によって実施する場合、260 nm に吸収を持つ不純物が含まれていないことを確認する必要がある。

また、可能な場合、濃度値が付与された認証標準物質によって値付けした標準物質を用いることで、トレーサビリティの確認を行うこともできる。

4.2.3 標準物質の入手

測定対象となる塩基配列については、CDCの Genetic Testing Reference Material Coordination Program¹⁾において reference material として確立された細胞株を、国内公的機関、例えば独立行政法人 産業技術総合研究所などが Coriell 医学研究所を通じて入手し、保存及び管理を行い、当該開発品の機能評価を受託業務として実施するので、それらを利用することができる。なお、ヒトゲノムCDCサンプルの保存中又は培養による後天的変異を監視するための定期的な検査も可能である。精度管理用標準物質としては、産業技術総合研究所が頒布するトレーサビリティが確立された認証標準物質を利用することができる。

注¹⁾ Genetic Testing Reference Material Coordination Program (GeT-RM)は、遺伝子検査におけるQC、研究、検定試験や測定データの検証に適した参照物質を研究者が利用できるよう、CDC主導の基に設立された綱領である。)

5. 英文版ガイドライン

「遺伝子発現解析用 DNA チップ開発ガイドライン 2010（案）」について、国外への情報発信や国外からの問い合わせに対応するために、以下の英語版（暫定版）を作成した。

R&D Guideline for DNA Microarrays for Gene Expression Profiling, 2010(Draft)

英語版の詳細については医療機器開発ガイドライン検討実務委員会・事務局までお問い合わせください。

【事務局】 TEL/FAX : 029-861-7840 E-Mail : human-ws@m.aist.go.jp

=====

R&D Guideline for DNA Microarrays for Gene Expression Profiling, 2010(Draft)

The guideline in English has been prepared for providing information abroad and handling inquiries from foreign countries.

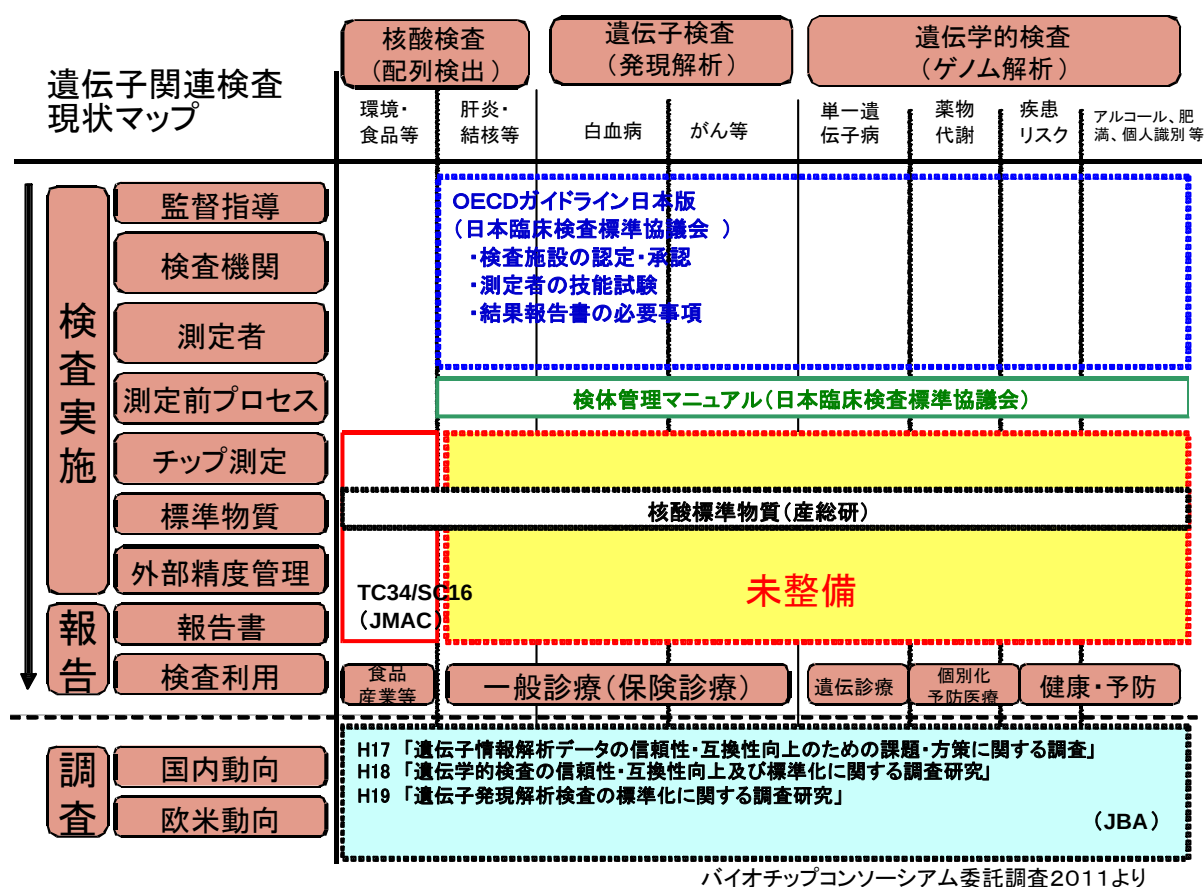
For more information, please contact **The Secretariat of R&D Guideline for Medical Device.**

【Secretariat】 TEL/FAX : 029-861-7840 E-Mail : human-ws@m.aist.go.jp

6. 平成 23 年度の総括と今後の展望

「遺伝子関連検査」は遺伝子検査、核酸検査、遺伝学的検査にわかれるが、中でも遺伝子発現解析に基づく検査である遺伝子検査については、2006 年には年間 400 万件の検査があった（日衛協資料）。しかし、そのほとんどは感染症診断用の検査であった。遺伝子関連検査の現状は、まだ未整備の部分が多く、測定前プロセス（いわゆるプレアナリシス）のマニュアルが日本臨床検査標準協議会（JCCLS）により策定された段階であり、チップを使った包括的な検査など多くの検査実施項目については未整備である（図「遺伝子関連検査現状マップ」参照）。今後、企業による遺伝子関連検査のアプリケーション開発が進むとともにこのような実施項目の整備が進むと考えられるが、技術的な開発ポイントの情報はますます重要になると考えられる。

遺伝子関連検査 現状マップ



バイオチップの市場動向については、「2007 年版ワールドワイド・バイオチップ&装置市場の動向と展望」（Fuji-Keizai USA）によると世界のバイオチップ（DNA/RNA バイオチップ）市場は 2006 年は約 25 億ドルで、2010 年には 40 億ドルになると予想されていたが、リーマン・ショックなどの世界的な不況により、実際は約 15 億ドル程度（80 円換算で 1217 億円、2011 年：BBC リサーチ報告書）であった。一方で、日本の市場は DNA チップ・装置は 47 億 5 千万円（2011 年、富士経済）であり、診断用 DNA チップに限定すればまだほとんど市場は無い。

しかし、これは DNA チップが使えない技術であるということではない。遺伝子診断に使う遺伝子の数によって使う技術は異なっていて、遺伝子の数が 1～数個の場合は多くの方法が使えるが、

数個～数十個だと PCR 法か SAGE 法（シーケンスによる方法）か DNA チップ法で、それ以上だとほとんど DNA チップしか使えない。現在は、少ない遺伝子数で診断する疾患の診断技術の開発が進んできているが、まだ DNA チップでしか解析出来ないような多くの遺伝子を使う遺伝子診断例が少ないので利用が進んでいないと考えられるが、今後はそのような疾患（例えば生活習慣病や神経性の疾患や多くのがんなど）の遺伝子診断法の開発が進むとともに DNA チップによる診断技術が進歩するものと期待される。

本年度、本事業では合計 3 回の開発ワーキンググループ委員会を開催し、遺伝子発現解析用 DNA チップに関する開発ガイドラインの策定を進めた。また、遺伝子診断用 DNA チップに関する最新情報を得るために、特定非営利活動法人バイオチップコンソーシアム研究部主任研究員山本伸子氏による国内外の開発動向に関する話題提供（「遺伝子発現解析用 DNA チップ開発動向について」：「3.2.1 話題提供（1）」項参照）と、プレシジョン・システム・サイエンス株式会社住谷知明氏による話題提供（「検体前処理における核酸抽出とその自動化-PSS の技術紹介-」：「3.2.1 話題提供（2）」項参照）及び、富山大学消化器・腫瘍・総合外科嶋田裕先生による話題提供（「診断 DNA chip への期待と問題点」：「3.2.1 話題提供（3）」項参照）と、事務局による「本年度 DNA チップ開発ガイドライン事業の説明」（第 1 回開発ワーキンググループ委員会）を行なった。さらに、詳細な情報を得るために、バイオチップコンソーシアム（JMAC）に調査を委託し（3.3 委託調査項参照）、遺伝子発現解析用 DNA チップに関するガイドライン策定の背景と経緯をまとめるとともに、企業ヒアリングによりその必要性や各国のガイドラインや国際標準などとの関係について最新情報を得た。また、本年度ガイドライン策定に必要な情報として、FDA 資料や SPIDIA ニュースレターの翻訳資料を作成した（「3.4 欧米における DNA チップ関係の規制及び報告書」項参照）。また、DNA チップに関するアプリケーションと信頼性の評価例をいくつかの化学物質について試験した結果を実証試験例として示した（「3.5 DNA チップに関する実証試験」項参照）。

これらの情報をもとに、開発ワーキンググループ委員会で、「概要」、「測定装置」、「評価法」、「標準物質」に分けてガイドラインの検討を行い、検討結果を「遺伝子発現解析用 DNA チップ [改訂版] 開発ガイドライン 2010（案）」としてまとめた（「4. ガイドラインの検討結果」項参照）。

本事業で得られたガイドライン案は経済産業省と厚生労働省の合同検討会（経済産業省の「医療機器開発ガイドライン評価検討委員会」と厚生労働省の「次世代医療機器評価指標検討会」の合同検討会）に提言として提出され、検討された（平成 24 年 3 月 9 日、第 11 回合同検討会）。そこで承認を得られれば、それぞれの省において以下の様な形で公表・活用される予定である（図「想定される成果」参照）。

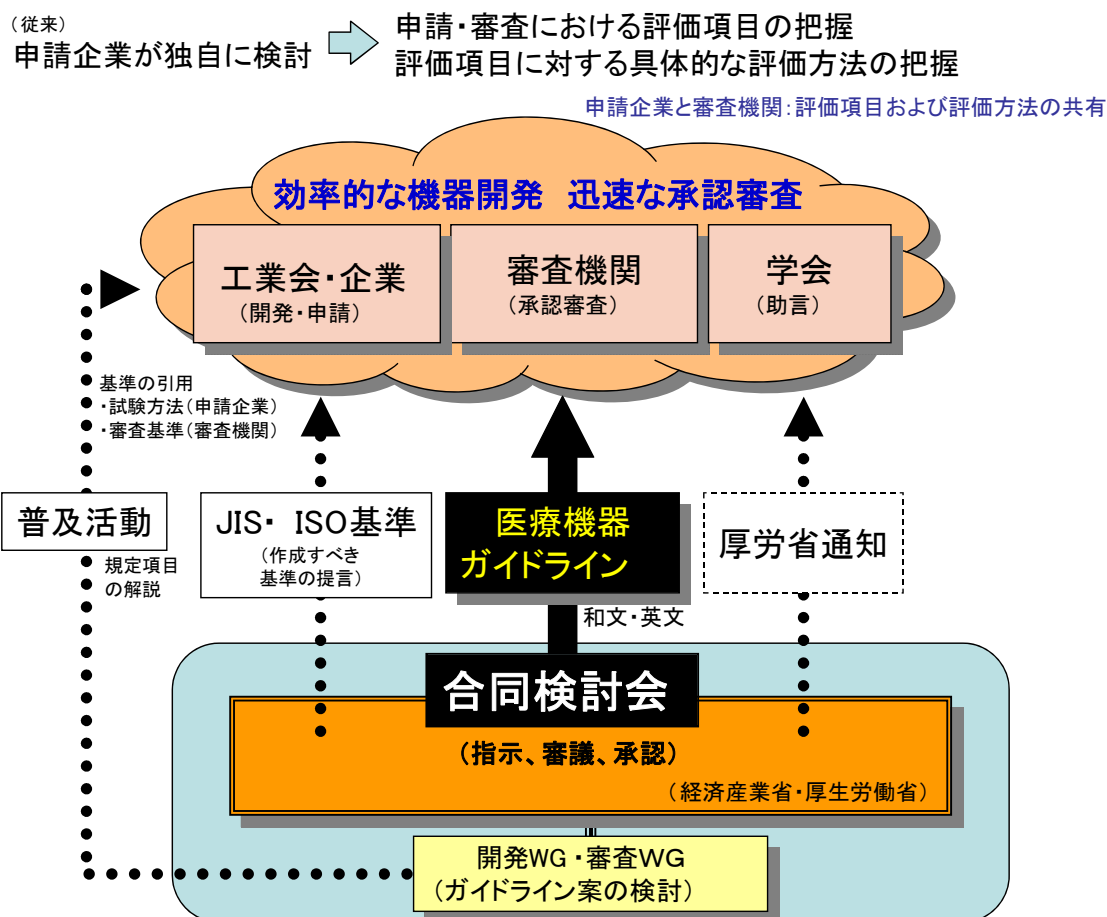
- (1) ガイドラインの公表。
- (2) 評価指標などの通知の発出。
- (3) JIS
などの基準の検討。

これらのガイドライン・評価指標などが、工業会・企業における効率的な機器開発に貢献し、審査機関においては迅速な承認審査に寄与し、学会においても研究開発などに有用な情報源となることを真に期待したい。

一方で、本事業においても、ガイドラインの普及活動を行うことでガイドラインの有用性の理解を広めることも重要である。また、テーラーメイド医療機器としては DNA チップ以外の遺伝子診断装置が存在していることから、本事業の成果が遺伝子診断装置やその検体調製装置など、多くの関連する医療機器にも活用されることを期待したい。

本年度は、震災などの影響で実質的な活動期間が限られたが、本報告書にまとめたような成果を得ることができたのは開発ワーキンググループ委員のお陰である。加えて、本事業の事務局スタッフの支援無しには本事業は達成できなかった。ここに感謝したい。

想定される成果



参考資料

1. 本年度ガイドライン事業の説明資料
2. 本年度 DNA チップ開発ガイドライン事業の説明資料
3. 委託調査報告
 - 3.1 「遺伝子発現解析用 DNA チップ開発状況調査最終報告」
特定非営利活動法人バイオチップコンソーシアム事務局長 中江裕樹氏
 - 3.2 「平成 23 年度委託研究遺伝子発現解析用 DNA チップ開発状況調査」最終報告書
特定非営利活動法人バイオチップコンソーシアム

1. ガイドライン事業の説明

開発ガイドライン事務局（木山）による本年度ガイドライン事業の説明
（第1回開発ワーキンググループ委員会資料）

医療機器等の開発・実用化促進のための ガイドライン策定事業(経済産業省)

The Guideline Program for Medical Device Development



「国民の長寿」と「質の高い生活」を実現

=> 新しい医療機器の開発と円滑な臨床導入が不可欠

医療機器産業の育成・産業創出、国際競争力の強化、
迅速な開発と審査が求められている



医療機器ガイドラインの策定

次世代医療機器ガイドライン策定事業(経済産業省と厚生労働省の連携)
において、行政、学会、産業界などが連携

次世代医療機器に対する開発ガイドラインと評価指標

「国民の長寿」と「質の高い生活」を実現

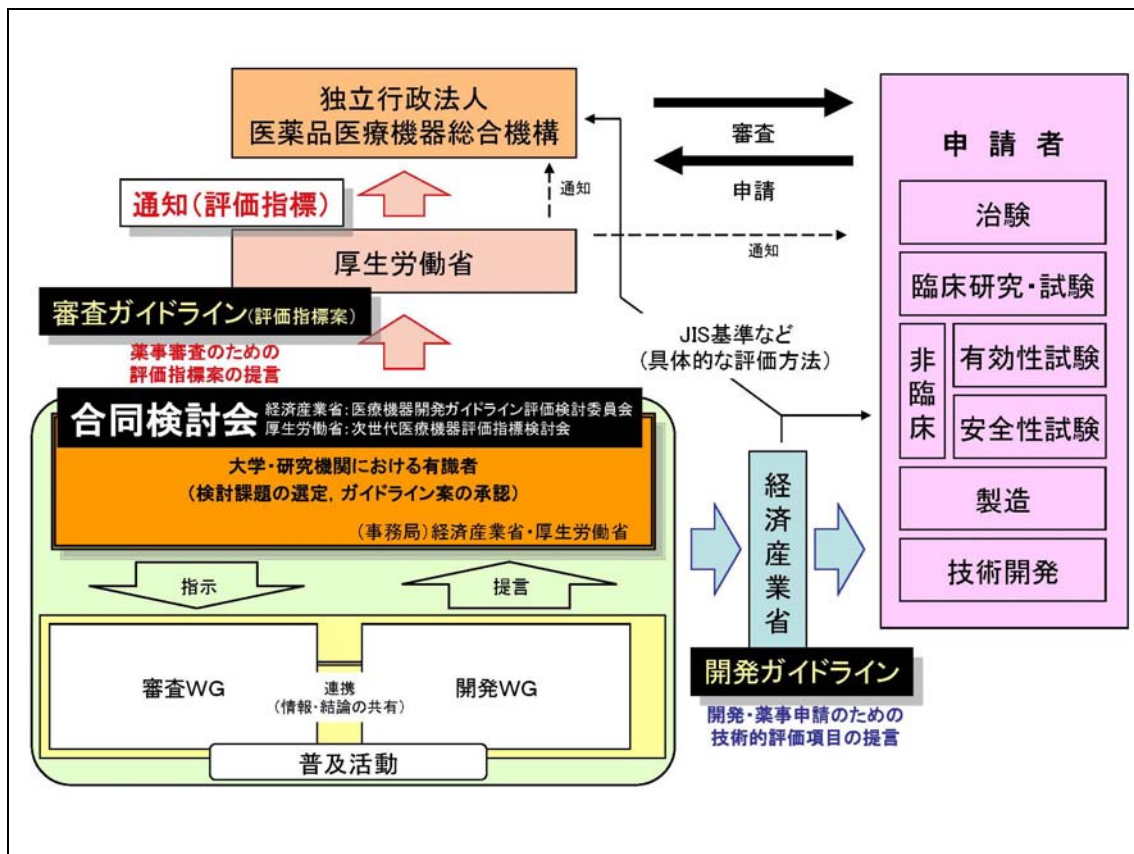
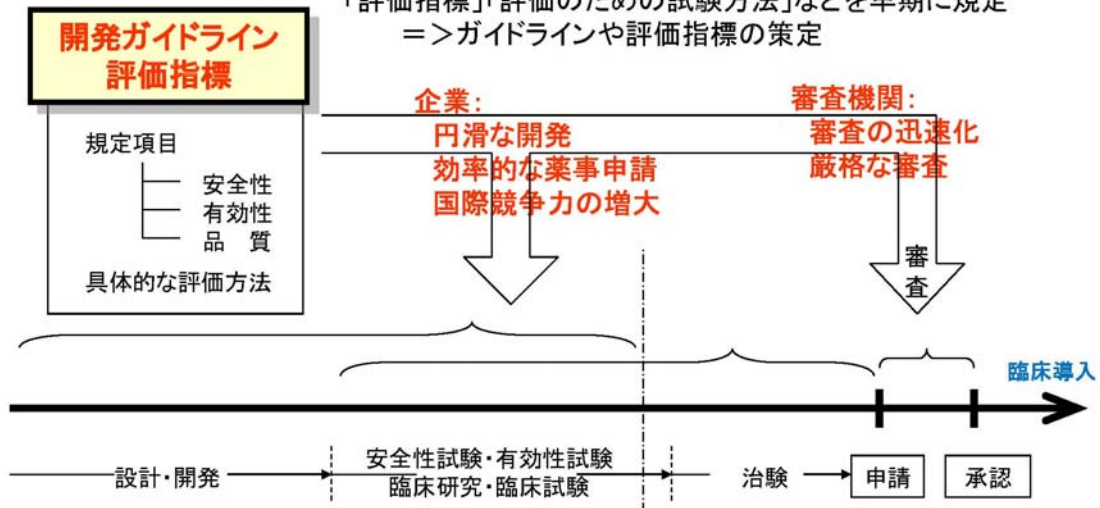
=>新しい医療機器の開発と円滑な臨床導入が不可欠

医療機器産業の育成・新規参入、国際競争力の強化

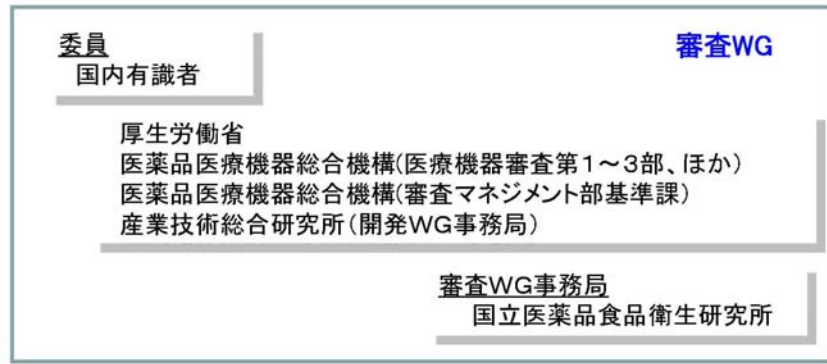
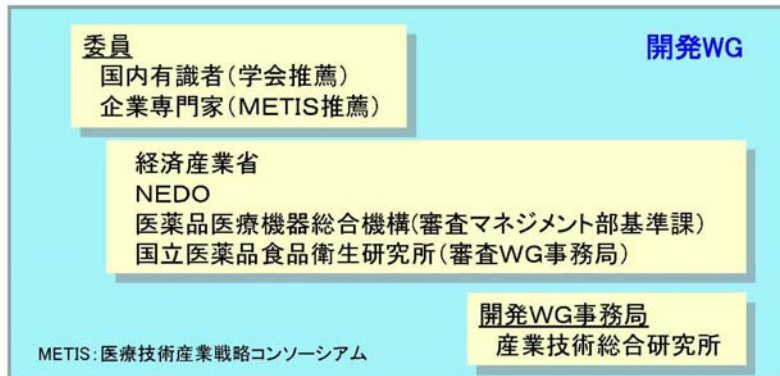
=>円滑な開発、効率的な薬事申請、迅速な薬事審査が必要

「評価指標」「評価のための試験方法」などを早期に規定

=>ガイドラインや評価指標の策定



WGメンバーの構成



提案した開発ガイドラインおよび評価指標

(平成17年度～平成22年度)

医療機器開発ガイドライン (開発のための)	医療機器評価指標 (審査のための)
高機能人工心臓システム DNAチップ 骨折修復支援システム 脳腫瘍焼灼レーザシステム ナビゲーション医療分野共通 次世代(高機能)人工股関節 ハイブリッド型人工骨・骨補填材 ヒト細胞培養加工装置についての設計ガイドライン(改訂版を含む) 植込み型神経刺激装置 ナビゲーション医療機器の位置的性能の品質担保 除染バスボックス設計ガイドライン カスタムメイド骨接合材料 無菌接続インターフェース設計ガイドライン(案) カスタムメイド人工股関節の開発ガイドライン(案) 遺伝子発現解析用DNAチップ(案) コンピュータ検出支援装置の性能評価項目(案) 医療機器におけるソフトウェア品質管理(案) トレーニングシステム開発ガイドライン(案)	次世代型高機能人工心臓の臨床評価のための評価指標 DNAチップを用いた遺伝子型判定用診断薬に関する評価指標 骨折修復支援装置に関する評価指標 関節手術支援装置に関する評価指標 骨形成因子(BMP)含有人工骨に関する評価指標(案) 重症心不全細胞治療用細胞シートに関する評価指標 角膜上皮細胞シートに関する評価指標 角膜内皮細胞シートに関する評価指標 軟組織に適用するコンピュータ支援手術装置に関する評価指標 関節軟骨再生評価指標 神経機能修飾装置に関する評価指標 整形外科用骨接合材料カスタムメイドインプラントに関する評価指標 歯周組織治療用細胞シートに関する評価指標(案) カスタムメイド人工股関節に関する評価指標(案) DNAチップ等を用いる遺伝子発現解析装置(案) コンピュータ診断支援装置に関する評価指標(案)

医療機器開発ガイドラインの公開

http://www.meti.go.jp/policy/mono_info_service/service/iryou_fukushi/index.html

コンソーシアムの設立

「バイオチップコンソーシアム、JMAC(企業68社)」(平成19年10月)

承認に寄与したガイドライン

埋込み型補助人工心臓 2品目
DNAチップ 2品目

厚生労働省・通知「次世代医療機器評価指標の公表について」

- (1) 薬食機発第0404002号、平成20年4月4日
2品目: 高機能人工心臓システムとDNAチップ
- (2) 薬食機発第0118第1号、平成22年1月18日
4品目: 骨折修復支援装置、関節手術支援装置、重症心不全細胞治療用細胞シート、角膜上皮細胞シート
- (3) 薬食機発第0528第1号、平成22年05月28日
2品目: 角膜内皮細胞シート、軟組織に適用するコンピュータ支援手術装置
- (4) 薬食機発第1215第1号、平成22年12月15日
3品目: 関節軟骨再生、神経機能修復装置、整形外科用骨接合材料カスタムメイドインプラント

トップページ > 政策別に探す > モノ作り・情報・サービス産業 >

医療・福祉機器

**開発ガイドライン
経済産業省のHPIにて公開**

医療機器開発ガイドライン策定事業

【平成19年5月公表】

1.DNAチップ(PDF形式:180KB) 

2.高性能人工心臓システム(PDF形式:202KB) 

【平成20年6月公表】

3.ナビゲーション医療分野共通部分(PDF形式:974KB) 

4.骨折整復支援システム(PDF形式:236KB) 

5.脳腫瘍焼灼レーザスキャンシステム(PDF形式:232KB) 

6.次世代(高性能)人工股関節(PDF形式:198KB) 

7.ハイブリッド型人工骨・骨補填材(PDF形式:183KB) 

8.ヒト細胞培養加工装置の設計ガイドライン(PDF形式:1664KB) 

http://www.meti.go.jp/policy/mono_info_service/service/iryou_fukushi/index.html

医療機器審査管理室長通知



薬食機発第 0404002 号

平成 20 年 4 月 4 日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長

次世代医療機器評価指標の公表について

厚生労働省では、医療ニーズが高く実用可能性のある次世代医療機器について、審査時に用いる技術評価指標等をあらかじめ作成し、公表することにより、製品開発の効率化及び承認審査の迅速化を図る目的で、次世代型人工心臓、DNAチップ、骨折整復支援装置、関節手術支援装置、重症心不全細胞治療用細胞シート、角膜上皮細胞シートについて、必要と考える旨を、販売承認に留意の上、販売承認を希望する。

今般、次世代型人工心臓、骨折整復支援装置、関節手術支援装置、重症心不全細胞治療用細胞シート、角膜上皮細胞シートについて、必要と考える旨を、販売承認に留意の上、販売承認を希望する。

なお、本通知の写しを、会長、社団法人日本臨床工学技士会、長及び欧州ビジネス協会に送付する。

(1) 薬食機発第0404002号、平成20年4月4日

2品目: 高性能人工心臓、DNAチップ

(2) 薬食機発第0118第1号、平成22年1月18日

4品目: 骨折整復支援装置、関節手術支援装置、重症心不全細胞治療用細胞シート、角膜上皮細胞シート

(3) 薬食機発0528 第1号、平成22年05月28日

2品目: 角膜内皮細胞シート、軟組織に適用するコンピュータ支援手術装置

(4) 薬食機発1215第1号、平成22年12月15日

3品目: 関節軟骨再生、神経機能修復装置、整形外科用骨接合材料カスタムメイドインプラント

開発WGの事業報告書: 産業技術総合研究所のHPにて公開

開発ガイドライン

独立行政法人

産業技術総合研究所(産総研)

産総研ホーム

ニュース

研究紹介・成果

相談・手続き・問合せ

> 出版物・ビデオ > 報告書類 > 委託事業報告書

委託事業報告書

http://www.aist.go.jp/aist_j/aistinfo/report/entrust/index.html

■平成19年度 経済産業省委託事業

※平成19年度戦略的技術開発委託費 医療機器ガイドライン策定事業 事業報告書

審査WGの事業報告書: 国立医薬品食品衛生研究所のHPにて公開

審査ガイドライン

次世代医療機器評価指標検討会
医療機器評価指標ガイドライン策定
審査ワーキング・グループ(WG)

<http://dmd.nihs.go.jp/jisedai/>

想定される成果

(従来)

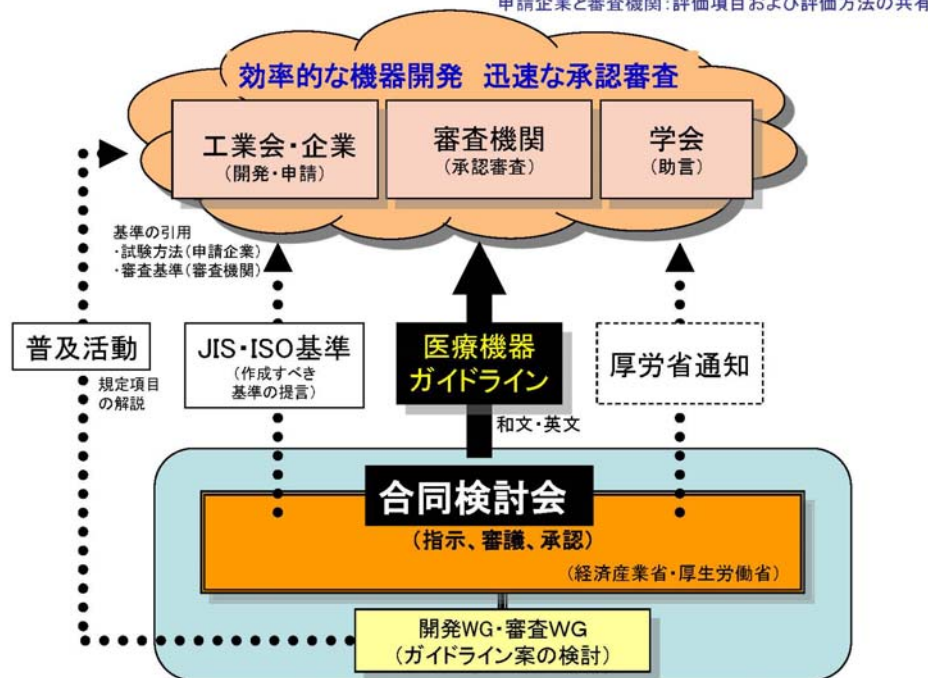
申請企業が独自に検討



申請・審査における評価項目の把握

評価項目に対する具体的な評価方法の把握

申請企業と審査機関: 評価項目および評価方法の共有



2. 本年度ガイドライン事業の説明

開発ガイドライン事務局による本年度 DNA チップ開発ガイドライン事業の説明
(第 1 回開発ワーキンググループ委員会資料)

平成23年度 テーラーメイド医療用診断機器分野
遺伝子発現解析用DNAチップ開発ワーキンググループ第1回委員会
平成23年11月16日

本年度DNAチップ開発ガイドライン事業の説明
(資料3)

DNAチップ開発ガイドライン事業について

ガイドラインの必要性

- ・次世代医療機器の開発（企業など）や薬事審査（厚労省など）には時間がかかるため、有用な情報が必要になった。
- ・ゲノム情報（塩基配列や遺伝子発現情報）の申請データが増えたため、データサブミッションの形式や基準などが必要になった。
- ・診断用DNAチップの開発や国外での薬事申請の動きが進み、我が国でも薬事申請が間近になった。
- ・FDAでは様々なガイダンスが公表された。

ガイドライン事業

- ・「テーラーメイド医療用診断機器分野」における開発ガイドライン策定事業（平成18～19年度、平成21～23年度）。
- ・「テーラーメイド医療用診断機器（DNAチップ）開発ガイドライン2007ー遺伝子型（ジェノタイプング）検定用DNAチップに関してー」公表（平成19年5月）。
- ・標準化（標準仕様書（TS）原案）を検討（平成19年度）。

薬事申請などの動き

- ・遺伝子型検定用DNAチップの薬事承認申請及び承認。
- ・IVDMI Aの薬事申請の動き。

遺伝子診断用DNAチップ

遺伝子型判定用DNAチップ

- ・遺伝子型判定を行うDNAチップ
- ・薬剤耐性遺伝子の多型判定（2009年薬事承認）
- ・ウイルスの遺伝子型判定（2009年薬事承認）
- ・多くの場合、一度判定すると再検は不必要
- ・がんの遺伝子型判定にも利用可（開発段階）

特徴

遺伝子発現解析用DNAチップ

- ・遺伝子の発現解析を行うDNAチップ
- ・乳がんの転移リスク判定など（FDA承認）
- ・経過判定など何度も使用する
- ・IVDMIA（体外診断多変指標測定）として有効
- ・がんの遺伝子発現解析に特に有効

東芝：蛍光色素を用いない電流検出型DNAチップ

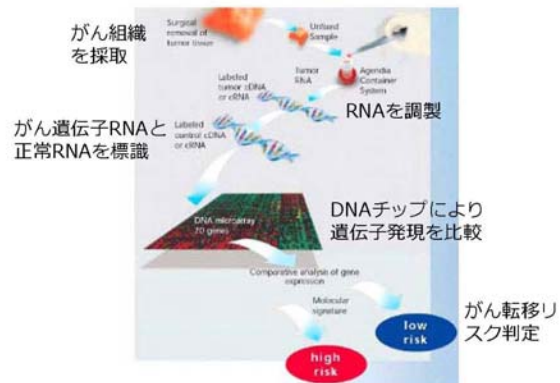


「ヒトパピローマウイルス型判別用DNAチップの薬事申請について」（2007年6月15日、東芝ホームページより）
 （内容）第一化学薬品株式会社、株式会社東芝、東芝ホクト電子株式会社は、共同で開発を進めてきたヒトパピローマウイルスを型判別するDNAチップの体外診断用医薬品の製造販売承認申請を行った。

技術・製品例

MammaPrint（蘭国Agendia社）

- ・細胞周期、浸潤、転移、血管新生などに関わる遺伝子70個を同時に測定し、特別のアルゴリズムを用いて、遠隔転移リスクをスコアで示す。



診断用DNAチップの開発動向

遺伝子型判定用DNAチップ

ロシュがP450の型判別DNAチップを体外診断薬として申請

ロシュ・ダイアグノスティクス（ロシュ・ダイア）は、薬物代謝酵素であるシトクロムP450の遺伝子型を調べるDNAチップ「AmpliChip CYP450」の体外診断薬としての申請を2007年2月5日に行った。

ロシュ・ダイアが申請したシトクロムP450型判別DNAチップは、スイスRoche Diagnostics社と米国Affymetrix社が共同開発した製品で、シトクロムP450の2D6の32種類の多型と2C19の2種類の多型の合わせて34種類の多型を判別できるもの。研究用試薬としては2006年5月に発売していた。

・「AmpliChip CYP450」の医薬品の製造販売承認を取得した（2009年5月12日）。



東芝ら3社、医療用DNAチップを薬事申請

第一化学薬品と東芝、東芝ホクト電子は、共同で開発してきたDNAチップの体外診断用医薬品製造販売承認申請（以下、薬事申請）を2007年5月31日に行った。子宮頸がんの原因であるHPV（ヒトパピローマウイルス）の型を判別できる。DNAチップの量産ラインの整備は完了しており、申請が承認されれば直ちに製品化する。承認までには「最短でも1年はかかる」（第一化学薬品）とした。

同製品について製造販売承認を取得した（2009年7月30日）。



DNAチップカセット



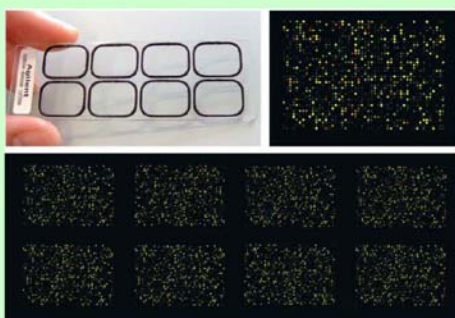
医療用DNA検査装置

診断用DNAチップの開発動向 遺伝子発現解析用DNAチップ

バイオチップコンソーシアム委託調査（平成22年度）

Agendia MammaPrint

- MammaPrint は乳癌の手術を受けた患者の転移・再発の可能性について情報を提供するサービス。手術によって切除された腫瘍における70 遺伝子の活性を測定することにより、患者の疾病の転移・再発リスクの高低を調べる。
- 2007 年2 月、MammaPrint は世界に先駆けて、多変量解析による遺伝子発現の検査として、アメリカ食品医薬品局(FDA)の初めての承認を受けた。
- 測定方法：マイクロアレイによる遺伝子発現解析(RNA チェック)
- サービス価格：¥380,000(税別)※健康保険適用外



Tissue of Origin Test

- 米食品医薬品局(FDA)が、患者の腫瘍から、癌の種類を決定する遺伝子診断装置「Pathwork Tissue of Origin test」を承認(2008年7月31日)
- マイクロアレイによる測定結果を乳癌や結腸直腸癌、胃癌など、15の悪性腫瘍の結果と比較して、原発組織の可能性を提示するIVDMIA。
- 477凍結バイオプシーサンプルの検査の結果、89%のサンプルで原発組織が特定され、少なくとも8種類の原発組織を92%以上の精度で特定できると報告されている。
- FDAは、2007年7月、診断用の検査「in vitro diagnostic multivariate index assay (IVDMIA)」に関するガイダンス案の2稿目を発表「MammaPrint」に次いで2番目のIVDMIA装置となる。



必要とされるガイドライン

バイオチップコンソーシアム委託調査（平成22年度）

(1) DNAチップ開発の問題点

- 単一の遺伝子の情報を得る方法に比べて複雑なため開発が難しい。
- 検査開発メーカーは、検査コンテンツの申請毎にDNAチップ・試薬安定性や再現性、および性能に関する試験が必要であり、負担が大きい。
- 臨床検体の調製法が多様なため、信頼ある測定が難しい。検体調製法や判定アルゴリズムなども考慮する必要がある。
- 検査開発用のプラットフォームが確立しないため、前処理にあたる「検体品質管理」の技術課題を定義できず、関連技術開発が進まない。

(2) 必要なガイドラインの内容

- GMP製造され、安定性・再現性・性能が認められたDNAチップ・試薬を検査開発用のプラットフォームとして承認するための開発ガイドライン。
- 各検査メーカーは、体外診断薬の承認申請毎にDNAチップ・試薬の基本性能試験を行う必要がなくなり、診断に応じたシグネチャー（遺伝子の組み合わせ）を開発し薬事申請する。

MicroArray Quality Control (MAQC) Project

ホームページ : <http://www.fda.gov/>

概要

米国FDAの陣頭指揮のもと 51の大学・企業などが**MAQCコンソーシアム**を設立し、1300枚以上のDNAマイクロアレイを用いたデータ取得とその解析を行い、DNAマイクロアレイの標準化を推進

活動内容

Phase I : DNAマイクロアレイの技術性能

2005年2月～2006年9月

Nature Biotechnology誌（2006年9月号）にて成果報告

Phase II : 個別化医療のための分類予測法の評価

2006年9月～2009年3月

Nature Biotechnology誌（2010年8月号）にて成果報告

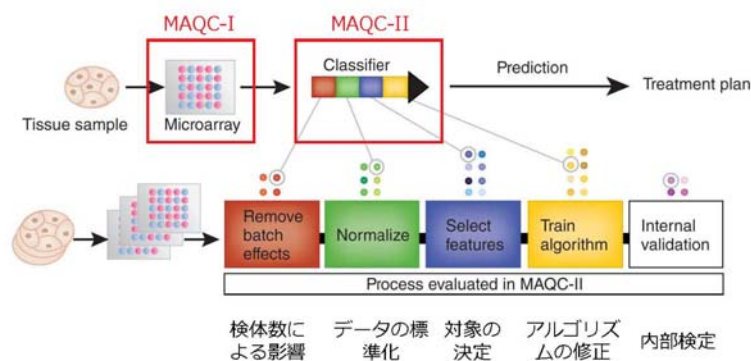
Phase III : 次世代シーケンサーの性能評価

2008年12月～

MAQC-IIの概要

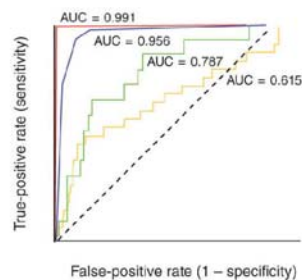
Nature Biotechnology誌
28巻, pp810 - 812 (News and Views)

DNAチップを用いた診断のプロセス



パフォーマンスの評価 (例)

数値化による比較 : AUC (Area under the receiver operating characteristic curve)



MAQC-IIの概要

Nature Biotechnology誌
28巻, pp827 - 838 (資料6-9)

6組のマイクロアレイデータセット
13種類の評価項目

6組のマイクロアレイ

トレーニングデータセット

バリデーションデータセット

Table 1 Microarray data sets used for model development and validation in the MAQC-II project

Date set code	Endpoint code	Endpoint description	Microarray platform	Training set ^a				Validation set ^a				Comments and references
				Number of samples	Positives (P)	Negatives (N)	P/N ratio	Number of samples	Positives (P)	Negatives (N)	P/N ratio	
Hamner	A	Lung tumorigen vs. non-tumorigen (mouse)	Affymetrix Mouse 430 2.0	70	26	44	0.59	88	28	60	0.47	The training set was first published in 2007 (ref. 50) and the validation set was generated for MAQC-II
Iconix	B	Non-genotoxic liver carcinogens vs. non-carcinogens (rat)	Amersham Uniset Rat 1 Bioarray	216	73	143	0.51	201	57	144	0.40	The data set was first published in 2007 (ref. 51). Raw microarray intensity data, instead of ratio data, were provided for MAQC-II data analysis

Table 1. Microarray data sets used for model development and validation in the MAQC-II project

Date set code	Endpoint code	Endpoint description	Microarray platform	Number of samples	Positives (P)	Negatives (N)	P/N ratio	Number of samples	Positives (P)	Negatives (N)	P/N ratio	Comments and references
Hamner	A	Lung tumorigen vs. non-tumorigen (mouse)	Affymetrix Mouse 430 2.0	70	26	44	0.59	88	28	60	0.47	The training set was first published in 2007 (ref. 50) and the validation set was generated for MAQC-II
Iconix	B	Non-genotoxic liver carcinogens vs. non-carcinogens (rat)	Amersham Uniset Rat 1 Bioarray	216	73	143	0.51	201	57	144	0.40	The data set was first published in 2007 (ref. 51). Raw microarray intensity data, instead of ratio data, were provided for MAQC-II data analysis

マイクロアレイデータセット：齧歯類での肺毒性または肝毒性、ヒトの乳がん、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫

評価項目：発癌、毒性、ネクローシス、治療効果、生存率など

マイクロアレイ：Affymetrix (mouse & human)、Amersham、Agilent社マイクロアレイ

モデル作成時に考慮されるファクター：(i) organization code; (ii) data set code; (iii) endpoint code; (iv) summary and normalization; (v) feature selection method; (vi) number of features used; (vii) classification algorithm; (viii) batch-effect removal method; (ix) type of internal validation; (x) number of iterations of internal validation.

パフォーマンスの評価内容：(i) MCC; (ii) accuracy; (iii) sensitivity; (iv) specificity; (v) AUC; (vi) mean of sensitivity and specificity; (vii) r.m.s.e.

MAQC-IIの概要（まとめ）

Nature Biotechnology誌
28巻, pp827 - 838 (資料6-9)

- MAQC-IIでは36組のデータ解析チームが13の評価項目について、6つのデータセットを用いて30,000以上のモデルを作成して行い、以下の結果を得た。
- モデルによる予測はエンドポイントに依存する度合いが大きい。
- データ解析チームによる影響が大きい。経験のあるチームが大学院生のチームより良い結果を示した。
- 内部検定のステップはうまくいくと外部検定の結果と高い一致を示した。
- 一つのデータセットに対して、同様な予測結果を示す複数のモデルを作ることが可能であることがわかった。
- 良いアルゴリズムを使うよりは良いモデルを使う方が重要である。
- 推奨するモデル作成手順は以下のようになる。

ステップ1（計画）：最良の方法はないが、妥当な計画作成、適度なサイズと評価項目の複雑さ、適度なデータの標準化が重要である。

ステップ2（予備試験と内部検定）：適度なデータサイズを目標にした5倍のクロスバリデーションを10回繰り返すような検定が妥当である。

ステップ3：（本試験と外部検定）：トレーニングデータセットとバリデーションデータセットを入れ替えて評価することも重要である。

SPIDIAとは

- ・「Standardisation and improvement of generic pre-analytical tools and procedures for in vitro diagnostics」の略
- ・4年間（2009～2012年）で1300万ユーロの予算（ECは900万ユーロ支出）
- ・7つの公的研究機関、8つの企業、ヨーロッパの標準化機関がコンソーシアムを設立
- ・体外診断薬に利用するプレアナリシスの標準化と改善を目標
- ・新規のアッセイ法や標準化バイオマーカーの探索により得られる科学的根拠をもとにプレアナリシスツールの最適化のためのガイドラインを策定

なぜSPIDIAが始まったのか

- ・核酸、タンパク質、代謝産物のプロファイルをもとにした体外診断薬の開発の進展
- ・これらの分子のプロファイルは輸送や保管などの影響を受けて変化するため正確な評価が困難
- ・検体の調製、取扱い、標準化、保管にはガイドラインが必要
- ・SPIDIAではガイドライン、標準化プロトコル、プレアナリシスツールの提供が目標

SPIDIAの活動

- ・3つの活動を進める

第1の活動：体外診断薬による診断のプレアナリシスに関する全ヨーロッパの品質管理プロトコルとガイドラインの策定

- ・組織、がん、血液、血清、血漿から採取されるDNA、RNA、タンパク質、及び、代謝産物にフォーカスする
- ・検体の品質管理に必要なバイオマーカーを探索する

第2の活動：体外診断薬による診断のプレアナリシスの弱点を克服する技術の開発と統合

- ・スワブによって採取した検体の自動化処理など組織、血液、非侵襲調製検体の標準化に関する新しい技術開発

第3の活動：新発見やガイドラインに関する情報を医療、研究、バイオバンクなどのコミュニティに発信し、倫理的問題への関心を高めコンプライアンスを求める

SPIDIAの進捗状況

SPIDIA Newsletter
10/2011 (資料6-8)

組織検体を用いた診断技術の開発における新しい展開

- ・「PAXgene Tissue System」：免疫組織解析法の標準化のための新しい組織の固定と安定化技術。
- ・ CD2, CD3, ERα, PR, Her2, cytokeratin 7, Ki67, S100, vimentinなどの抗体を検討。
- ・ 組織検体の採取と安定化及び運搬を標準化するためのプロトタイプ容器の性能評価。

血液検体を用いた分子診断のためのプレアナリシスをどのように改善し標準化するか

- ・ 30か国の219の研究室から322のアプリケーションを集めてプロトコルを検証。
- ・ DNA及びRNAの輪番検証：PAXgene Blood RNAチューブを用いて血液検体RNAを抽出し、SPIDIA研究室で品質評価：精製度と精製量（分光計測）、全体像（Agilent社）、GAPDH, IL1 beta, c-fos遺伝子の発現量(qPCR)、阻害物質評価（Kineretソフトウェア）。
- ・ 保存温度や精製法などのプレアナリシス変動要素について解析し、収量、精製度、全体像、などの品質との関係を明らかにして、ガイドラインのドラフトを作成。

検体品質管理バイオマーカーセットに関する解析

- ・ 組織のRNAとタンパク質、血中のRNA、尿、血清、血漿、組織のメタボロミクス解析。
- ・ プレアナリシスの変動によって影響を受けるRNAバイオマーカーの探索。

血液検体の処理に関する統合ワークフローの開発

- ・ 磁気ビーズ技術をもとに安定化した血液検体から低～中程度のスループットでRNAを精製する統合した自動化システムを目指す。
- ・ QIAAsymphony SP自動化検体調製プラットフォーム（QIAGEN社）をもとに全RNAを血液検体から精製する完全自動化プロトコルを開発。
- ・ 定量RT-PCR反応のための反応セットアッププロトコルを作成。

PAXgene Blood RNA System

PAXgene™ Blood RNA Systemは、ヒト末梢血RNA精製の標準化をサポートするトータルシステムです。採血、細胞内RNAの安定化、検体の保存（短期・長期）、輸送が1本の採血管で可能であり、RT-PCRやマイクロアレイ等に使用できる細胞内RNAを精製することができます。真空採血管にあらかじめRNA安定化剤を添加してあるため、採血した時点の遺伝子発現プロファイルを忠実に捉えることができます。

PAXgene™ Blood RNA Systemの特長

- 採血後速やかに細胞内RNAを安定化することにより、遺伝子転写物レベルの変動を最低限に抑えます。そのため、バラツキが少なく、再現性に優れた遺伝子発現解析結果を得ることができます。
- 体内での遺伝子発現プロファイルを忠実に捉えることができます。
- チューブ内のRNAは、室温（18～25℃）で3日間、冷蔵（2～8℃）で5日間、冷凍（-20℃あるいは-70℃）で50ヶ月安定です。
- 採血から保存、運搬、RNAの分離・精製までのプロセスを、ひとつの標準化されたシステムで一貫して行うことができます。複数の施設で検体採取を行う場合の手技統一にも有用です。
- BD ヘモガード™ キャップは、血液に手指が接触しないように設計されており、感染対策に有効です。

PreAnalytiX社について

PAXgene™シリーズは、BDとQIAGENのジョイントベンチャーであるPreAnalytiX社のブランド製品です。システムは、採血管と核酸精製キットから構成されており、採血管は日本BDから、核酸精製キットは株式会社キアゲンより販売しております。



昨年度のDNAチップ開発ガイドライン事業について

開発WGメンバー構成

林 慎一	東北大学医学部保健学科分子検査学分野	教授（座長）
秋山 英雄	東レ株式会社先端融合研究所	主任研究員
油谷 浩幸	東京大学先端科学技術研究センター	教授
楠岡 英雄	国立病院機構大阪医療センター	院長
久原 哲	九州大学大学院農学研究院	教授
桑 克彦	日本臨床検査標準協議会（JCCLS）	理事
橋本 幸二	東芝ディスプレイ・部品材料統括	新デバイス開発センター 参事

1.平成22年度の活動

- ・開発WG委員会：3回開催（平成22年10月4日、平成22年11月29日、平成23年2月14日）
- ・ガイドライン案（遺伝子発現解析用DNAチップ開発ガイドライン）策定作業（遺伝子型判定用DNAチップ開発ガイドライン2007、米国FDA資料、MAQC報告などの参考資料をもとに策定）
- ・委託調査：国内企業開発動向（ヒアリング）、薬事申請に関する国内外の動き（申請状況、ガイドラインなど）、標準化動向などの調査
- ・話題提供：開発動向（DNAチップ研究所）、がんワクチンの判定DNAチップ開発例の紹介（九州大）
- ・「遺伝子型判定用DNAチップ開発ガイドライン2007」の英訳

2.ガイドラインの検討項目

- ・測定装置、評価法、標準物質に分けて検討事項を抽出
- ・FDAなどの資料をもとに各項目の内容を検討

3.次年度における検討内容（案）

- ・「遺伝子発現解析装置」の検討、標準化の支援活動、審査WG（評価指標）との連携

遺伝子発現解析用DNAチップ開発ガイドライン（案）概要

テラーメイド医療用診断機器（DNAチップ）開発ガイドライン2011-遺伝子発現解析用DNAチップに関して（平成22年度開発ガイドラインWG委員会最終案）

1. 概要

- 1.1 遺伝子発現解析用DNAチップ
- 1.2 本ガイドラインの目的と範囲
- 1.3 検査対象とリスク
- 1.4 先行事例

2. 測定装置(チップと装置)

- 2.1 原理と構造
 - (1)遺伝子発現解析用DNAチップの検出原理
 - (2)チップと装置の構造
- 2.2 方法
 - (1)検出の概要
 - (2)装置の機能
- 2.3 特異性、感度・ダイナミックレンジ、再現性
 - (1)特異性
 - (2)感度・ダイナミックレンジ
 - (3)再現性
 - (4)検査の品質管理
 - (5)その他、性能特性に影響する要因
- 2.4 必要とするサンプル・検体、その前処理・保存等、試薬について
 - (1)検体
 - (2)検体の前処理
 - (3)サンプルの保存法
 - (4)試薬
 - (5)試薬の保存性・安全性

2.5 ソフトウェア

- (1)装置を構成するソフトウェアの概要
- (2)判定アルゴリズムの原理と概要
- 2.6 データ処理
- 2.7 品質管理
 - (1)DNA チップ
 - (2)検査装置

3. 評価法

- 3.1 評価項目
- 3.2 他の発現解析手法との比較
- 3.3 データ解析、解析ソフトについて
- 3.4 有意性の検定
- 3.5 比較試験・臨床評価試験
- 3.6 判定アルゴリズム
- 3.7 データの管理について
- 3.8 安全性について

4. 標準物質

- 4.1 目的
- 4.2 標準物質に求められる要件
 - 4.2.1 標準物質の選定
 - (1)一次標準物質（認証標準物質）の選定
 - (2)二次標準物質の選定
 - 4.2.1 標準物質の管理
 - (1)品質管理
 - (2)純度
 - (3)濃度単位
 - 4.2.2 外部標準物質の入手

テーラーメイド医療用診断機器（DNAチップ）開発WG 平成23年度活動予定

開発WGメンバー構成

林 慎一	東北大学医学部保健学科分子検査学分野	教授（座長）
秋山 英雄	東レ株式会社先端融合研究所	主任研究員
油谷 浩幸	東京大学先端科学技術研究センター	教授
楠岡 英雄	国立病院機構大阪医療センター	院長
久原 哲	九州大学大学院農学研究院	教授
桑 克彦	日本臨床検査標準協議会（JCCLS）	理事
住谷 知明	プレシジョンシステムサイエンス株式会社	執行役員・事業開発部長
橋本 幸二	東芝ディスプレイ・部品材料統括	新デバイス開発センター 参事

平成23年度の活動予定

- ・ WG：3回開催予定
- ・ バイオチップコンソーシアムによる開発や標準化などの現状調査
- ・ 遺伝子発現解析用DNAチップ開発に関わるガイドライン項目の検討
- ・ 開発ガイドラインの策定と経済産業省への報告
- ・ 第11回合同検討会にて活動報告予定

平成23年度委託調査について

調査を必要とする理由

DNAチップに関するガイドライン案を作成するためには、現状と動向に関して迅速にかつ包括的に情報を取得する必要がある。ガイドラインの必要性を高め、多くの企業へ普及を進めるために、国際的な標準化に関する動向調査や国内外の企業の開発動向のヒアリングを含めた調査を専門の企業に委託することが必要である。

調査内容

① 国内外DNAチップ関連企業に対する製品開発のヒアリング調査

国内外DNAチップ関連企業に対して聞き取り調査を行い、市場動向、特許動向、開発の問題点、標準化が必要な技術内容などを把握する。（昨年度はバイオチップコンソーシアム所属企業に限定）

② 米国FDA/MAQC及び欧州EU/SPIDIAに関する動向調査

DNAチップの標準化を進める米国企業を中心としたコンソーシアムであるMAQCコンソーシアムはDNAチップの標準化に関して世界をリードしており、FDAとも連携して診断用DNAチップの標準化を進めている。一方で、遺伝子検査の検体の標準化を進める欧州EU/SPIDIAの動向は今後のDNAチップ開発へ大きな影響を与えることが明らかになった。したがって、これらの動向について調査をすることで本事業におけるDNAチップガイドライン作成及び利用にとって有用な情報を得ることができると考えられる。（昨年度は主としてFDA/MAQCの文献調査）

③ DNAチップによる遺伝子診断の基盤になる研究に関する調査

今後DNAチップ試験を利用して診断する可能性の高い遺伝子検査に関して、疾患と診断・治療の内容、研究状況、診断に関する技術的情報に関して調査を行う。（昨年度は遺伝子検査一般に関する調査）

本年度の検討内容案

遺伝子発現解析用DNAチップガイドラインに関する本年度の検討内容案

1. MAQC-II報告をもとにした、「予測モデル(classifier)」に関するモデルや統計法などに関するガイドライン項目を検討する。
2. SPIDIAの中間報告をもとにした、「プレアナリシス」に関するガイドライン項目を検討する。
3. 審査WGで検討される臨床性能評価に関する議論をもとにした、遺伝子発現解析用DNAチップの開発や装置等の性能評価に関するガイドライン項目を検討する。
4. ガイドラインの英文訳を検討する。

資料5参照

関連するガイドライン案項目 1

2.4 必要とするサンプル・検体、その前処理・保存等、試薬について

(1)検体

検体の品質がRNAの品質やRNA増幅・標識に大きく影響するため、RNAを得る検体の種類（例えば血液、組織）およびその採取方法、採取量について検討すること。また検体の管理・保管方法については検討することが望ましい。

(2)検体の前処理

検体からRNAを抽出・精製する方法について検討すること。またRNAの分解を防ぐための留意点を記すとともに、使用するRNAの品質の評価法について明記して測定結果を保証できるRNAの品質基準を設定すること。なおRNAをなんらかの増幅法で増幅した上で用いる場合には、その増幅法と使用する試薬について検討すること。増幅したRNAを標識した上で後段の反応に使用する場合には、その処理法と使用する試薬について検討すること。

(3)サンプルの保存法

検体、精製RNA、増幅RNA、標識RNA、といったすべての段階のサンプルについて、保管法及び輸送法を検討すること。すなわち、保管・輸送に適した温度と性能を維持できる期間について明記すること。

(4)試薬

RNAの抽出・検査など各工程で使用される試薬について、その種類・濃度などに関して検討することが望ましい。試薬をDNAチップと共に提供する場合、再現性、精度等に対する試薬の影響について、プロセスの各段階で検証した結果を残すことが望ましい。試薬をDNAチップと共に提供しない場合には、DNAチップ使用者が適切な試薬を選択できるよう、必要な試薬の仕様およびRNAの品質と量を評価するための方法・仕様を技術的に検討すること。

(5)試薬の保存性・安全性

各工程の反応に使用される試薬の保管法・輸送法についても検討すること。また各工程で使用される試薬の安全性、および安全な取り扱いに必要な注意事項を検討することが望ましい。

関連するガイドライン案項目2

3.3 データ解析、解析ソフトについて

解析ソフトについては、同一データから同一の結果が得られること。その再現性を保証するためには、アルゴリズムを明確に表現することが望ましく、具体的には正規化の手法、データ補正の方法、マーカー遺伝子の抽出方法、判定の方法などを数式等で表し、数値化したデータに基づき判定されることが望ましい。

3.4 有意性の検定

データの解析法、解析評価に用いたソフトウェア、および統計分析に関して検討することが望ましい。なおデータの処理、解析ソフトウェアについては、詳細を記した説明書を作成すること。失敗事例（判定不能、器具の故障、試薬の不具合等に起因するもの）に関しても分析することが望ましい。また一致率の基準としては、他の診断薬が存在する場合は正答率を一応の目安とする。

3.5 比較試験・臨床評価試験 (省略)

3.6 判定アルゴリズム

DNAチップを用いた診断においては、複数遺伝子の発現パターンよりアルゴリズムで判定を行う。アルゴリズム作成に必要な検体数について規定はないが、アルゴリズムの検証のための臨床性能試験は、一般の既存の体外診断薬に関する基準に基づき、複数施設から収集したサンプルを用いた統計的有意差を示すデータの提出が要求される。ただし、患者数が限られている場合や、より少ない症例数で有効性が十分に示される場合、或いは医師による日常的な観察と併せて、診療上の意思決定を補完する目的においてのみ利用される場合にはこの限りではない。

3.1 「遺伝子発現解析用 DNA チップ開発状況調査最終報告」

特定非営利活動法人バイオチップコンソーシアム事務局長 中江裕樹氏

(第3回開発ワーキンググループ委員会資料)

遺伝子発現解析用DNAチップ開発状況調査

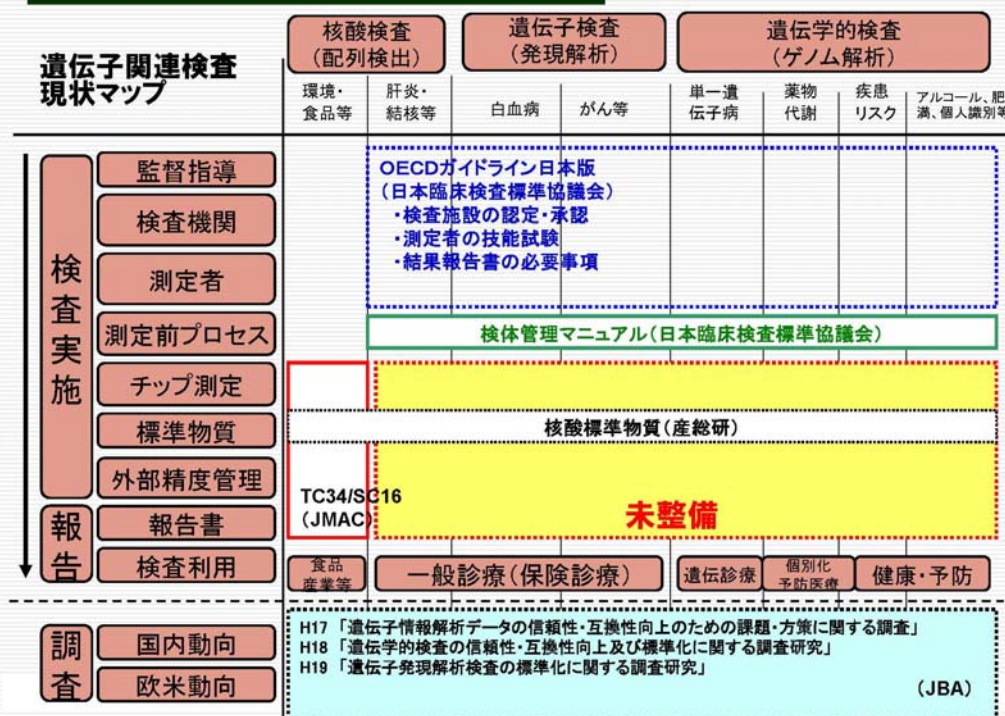
JMAC

特定非営利法人バイオチップコンソーシアム

©JMAC 2007-2012. All Rights Reserved

CONFIDENTIAL

遺伝子関連検査 現状マップ



ガイドラインに関連する活動



地域	ガイドライン	時期	内容等
欧州	SPIDIAプロジェクト	2008-	前処理過程の標準化
米国	MAQC I and II	2005-	マイクロアレイ測定の標準化
	RT-PCR用前処理ガイドライン	2005	Class II Special Controls Guidance Document: RNA Preanalytical Systems (RNA Collection, Stabilization and Purification Systems for RT-PCR used in Molecular Diagnostic Testing)
	IVDMIAガイドライン	2007	Draft Guidance for Industry, Clinical Laboratories, and FDA In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assays (IVDMIA)
	乳がん予後予測ガイドライン	2007	Class II Special Controls Guidance Document: Gene Expression Profiling Test System for Breast Cancer Prognosis 2007
	PGxデータ提出ガイドライン	2007	
	遺伝形質の分子遺伝学的検査のためのGLP	2009	Good Laboratory Practices for Molecular Genetic Testing for Heritable Disease and Conditions
日本	遺伝子型検定用DNAチップ(経済産業省)	2007	テラーメイド医療用診断機器(DNAチップ)開発ガイドライン -遺伝子型(ジェノタイピング)検定用DNAチップに関して-
	遺伝子型判定用DNAチップ(厚生労働省)	2008	次世代医療機器評価指標の公表について -DNAチップを用いた遺伝子型判定用診断薬に関する評価指標-
OECD	分子遺伝学的検査における質保証に関するOECDガイドライン	2007	OECD GUIDELINES FOR QUALITY ASSURANCE IN MOLECULAR GENETIC TESTING
ISO	GMO検出	-	Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products
	マイクロアレイ解析	2010-	NWIP - CD : General definitions and requirements for microarray detection of specific nucleic acid sequences

3

©JMAC 2007-2012. All Rights Reserved

ガイドライン活動とカバーする解析ステップ



地域	段階
	サンプル RNA (DNA) 測定 データ解析
欧州	SPIDIA
米国	MAQC I MAQC II Class II RNA Analysis (PCR) IVDMIA Breast Cancer Prognosis PGxDS
日本	遺伝子型検定用DNAチップ(経済産業省) 遺伝子型検定用DNAチップ(厚生労働省)
OECD	GLP for Molecular Genetic Testing
ISO	Methods of analysis for GMO detection NWIP

発現解析チップに直接関係

チップ測定を含まない

発現解析チップ利用を前提とせず

CONFIDENTIAL

4

©JMAC 2007-2012. All Rights Reserved

2011年中に発表された新ガイドライン



FDA



2011年7月14日
IVDコンパニオン
診断デバイス
(ドラフト)



2011年8月10日
E16



2011年8月15日
ベネフィット・リスク
(ドラフト)

欧州



2011年7月12日
ゲノムバイオマーカー
臨床試験

日本



平成23年1月20日
ICH E16



平成23年12月
検体品質管理マニュアル
(承認文書)

その他のガイドライン



2007年

分子遺伝学的検査における質保証に関するOECD
ガイドライン

OECD



2009年

遺伝形質の分子遺伝学的検査のためのGLP

CLIA

Draft Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff

In Vitro Companion Diagnostic Devices

DRAFT GUIDANCE

This guidance document is being distributed for comment purposes only.
Document issued on: July 14, 2011

ガイダンス草案

発行日：2011年7月14日

意見募集2011年9月10日まで（60日間）

部署：CDRH,CBER,CDER

- コンパニオン診断薬に関するドラフトガイダンスが発表された。
 - 双方の承認と、同時承認の原則
 - 双方の添付文書への記載
 - 同時治験（臨床性能試験）と、治験でのIED (Investigational device exemption), IND (Investigational new drug) としての取り扱い。

IVDコンパニオン診断デバイス

対象

- ・ コンパニオン診断薬に依拠する治療薬の開発者
- ・ 治療薬に対応したコンパニオン診断薬を開発しようとする者

目的

- ・ コンパニオン診断薬の定義
- ・ FDAがコンパニオン診断薬を管理する理由を説明
- ・ FDA承認義務の明確化
- ・ 可能な市販前承認パスウェイへの誘導
- ・ 医薬品の安全性有効性を確実にするためコンパニオン診断薬の併用を必要とする旨の、表示に関する法的承認要件を提示

コンパニオン診断薬の定義



- “IVDコンパニオン診断薬”とは、対応する治療薬の安全で効果的な使用のため、下記の目的にとって必須であるもの。
 - 特定の治療薬によって利益を享受されと考えられる患者を同定する。
 - 特定の治療薬による治療の結果重大な副作用のリスクが増大と考えられる患者を同定する。
 - 安全性と薬効を向上させるための、治療の最適化(スケジュール、ドーズ、中断)を目的とした治療に対する反応のモニター

IVDコンパニオン診断デバイス



FDAのスタンス

本定義には、臨床ラボ検査を含めない。医師にとって治療薬の有効性の情報をもたらすとされていても、治療薬の安全性と効能を決定する要因となるものではない。

例) 生化学検査 (血清中のクレアチニン、トランスアミナーゼなど)

バイオマーカーに関するガイドライン



Guidance for Industry

E16 Biomarkers Related to
Drug or Biotechnology
Product Development:
Context, Structure, and
Format of Qualification
Submissions

ICH = International Conference
on Harmonisation of Technical
Requirements for Registration
of Pharmaceuticals for Human
Use

最終ガイダンス

発行日：2011年8月10日

発行： ICH 日米EU医薬品規制調和国際会議

医薬品またはバイオテクノロジー応用医薬品の開発におけるバイオ
マーカー：適格性確認のための資料における用法の記載要領、資料
の構成及び様式

日本も参加

©JMAC 2007-2012. All Rights Reserved

CONFIDENTIAL

日本も参加

薬食審発第0120第1号
薬食安発第0120第1号
平成23年1月20日

各都道府県衛生主管部（局）長 殿

厚生労働省医薬食品局審査管理課長

厚生労働省医薬食品局安全対策課長

医薬品またはバイオテクノロジー応用医薬品の開発におけるバイオマーカー：
適格性確認のための資料における用法の記載要領、資料の構成及び様式

近年、優れた新医薬品の地球規模での研究開発の促進と、患者への迅速な提
供を図るため、承認審査資料の国際的ハーモナイゼーション推進の必要性が指
摘されています。このような要請に応えるため、日米EU医薬品規制調和国際
会議（ICH）が組織され、品質、安全性及び有効性を含む各分野で、ハーモ
ナイゼーションの促進を図るための活動が行われているところです。

今般、ICHの合意に基づき、別添のとおり「医薬品またはバイオテクノロジー
応用医薬品の開発におけるバイオマーカー：適格性確認のための資料にお
ける用法の記載要領、資料の構成及び様式」（以下「本ガイドライン」という。）
がとりまとめられましたので、下記について御知照の上、貴管下関係業者等に
対して周知方御配慮願います。

なお、本ガイドラインは、独立行政法人医薬品医療機器総合機構のホーム
ページに掲載予定ですので、併せてお知らせいたします。（ICH 情報ページ：
http://www.pmda.go.jp/ich/ich_index.html）

記

別添

ICH E16:

医薬品またはバイオテクノロジー応用医薬品の開発における

バイオマーカー：

適格性確認のための資料における用法の記載要領、
資料の構成及び様式

1. はじめに	2
1.1 背景	2
1.2 目的	2
1.3 ガイドラインの適用範囲	3
1.4 一般原則	3
2. バイオマーカーの適格性確認に関する提出資料の構成	5
2.1 セクション1: 各地域の行政情報	6
2.2 セクション2: 概要	6
2.2.1 バイオマーカーの適格性確認に関する総論的評価	6
2.2.2 データの概要（必要に応じて、分析、非臨床、臨床）	11
2.3 セクション3: 品質	12
2.4 セクション4（非臨床）及び5（臨床）	12
3. 略称	14

平成23年1月20日
薬食審査発0120第1号
薬食安0120第1号

1

©JMAC 2007-2012. All Rights Reserved

CONFIDENTIAL

バイオマーカーに関するガイドライン



目的：

ゲノムバイオマーカー適格性確認にあたり、規制当局提出資料への用法記載要領、資料の構成、様式に関する推奨事項を示す。

規制当局・申請者の議論を促進させ、ICH規制地域間で利用可能である、国際共通化資料コモン・テクニカル・ドキュメント（CTD）の利用を提示している。

バイオマーカーに関するガイドライン



適用範囲：ゲノムバイオマーカー

※但し、ゲノム以外のバイオマーカーにも適用可能
プロテオミクス、イメージング、ゲノムとゲノム以外の
バイオマーカーの組み合わせ

一般原則：
推奨される文書の形式を紹介（CTDモジュールの利用）

セクション1	各地域の行政情報	CTDモジュール1
セクション2	概要	CTDモジュール2
セクション3	品質に関する文書	CTDモジュール3
セクション4	非臨床試験報告書	CTDモジュール4
セクション5	臨床試験報告書	CTDモジュール5

バイオマーカーに関するガイドライン



バイオマーカーの適格性確認に関する提出資料の構成

セクション1 各地域の行政情報	関係規制当局により規定される
セクション2 概要	◎バイオマーカーの適格性確認に関する総括評価 ◎以下に示す総括資料(適切な場合) ○分析法に関するデータ ○非臨床のバイオマーカーに関するデータ ○臨床のバイオマーカーに関するデータ
セクション3 品質に関する文書	◎バイオマーカーの適格性確認のための試験で用いる治験薬の構造、製造方法、品質特性(利用可能な場合)
セクション4 非臨床試験報告書	◎分析法の開発に関する報告 ◎分析法のバリデーションに関する報告 ◎非臨床試験報告書(in-vitro) ◎非臨床試験報告書(in-vivo、種を特定すること)
セクション5 臨床試験報告書	◎分析法の開発に関する報告 ◎分析法のバリデーションに関する報告 ◎臨床薬理試験報告書 ◎臨床の有効性及び/または安全性に関する試験報告書

©JMAC 2007-2012. All Rights Reserved

CONFIDENTIAL

市販前承認申請に関するガイドライン



発行日：2011年8月15日

Draft Guidance for Industry and
Food and Drug Administration
Staff

Factors to Consider when Making
Benefit-Risk Determinations in
Medical Device Premarket Review

DRAFT GUIDANCE

医療機器の市販前承認申請におけるベネフィット・リスク評価時に考慮すべき因子を記載

内容

- ・市販前承認申請において、FDAがベネフィット・リスク評価時に考慮する因子
- ・ベネフィット・リスク評価の例

©JMAC 2007-2012. All Rights Reserved

CONFIDENTIAL

市販前承認申請に関するガイドライン



- ・市販前承認申請において、FDAがベネフィット・リスク評価時に考慮する因子について初の情報公開。
- ・医療機器のPMA承認のために、承認プロセスの予測性、一貫性、透明性を明らかにし、PMA承認を奨励する内容
- ・「安全性データ」と「効果データ」の使用
- ・「安全性データ」はリスク対策であり、メーカーのリスク低減能力を審査するもの。
- ・「効果データ」はベネフィット（恩恵）の考慮であり、デバイスによりリスクを上回るベネフィットが得られるかを決定する。
- ・そのデバイスの新規性も評価対象となる。これまでに治療法のない病気に対して初の技術である場合にこれを考慮する。
- ・ベネフィット・リスク評価用のワークシートを提供。市販後のデータ公開もありうるとし、承認プロセスの透明化を強調。

©JMAC 2007-2012. All Rights Reserved

CONFIDENTIAL

ゲノムバイオマーカーの臨床試験での利用に関する草案



Reflection paper on methodological issues associated with pharmacogenomic biomarkers in relation to clinical development and patient selection

(ゲノムバイオマーカーの臨床試験での利用に関する草案)

ガイダンス草案

発行日: 2011年7月12日

発行: 欧州医薬品庁 (EMA)

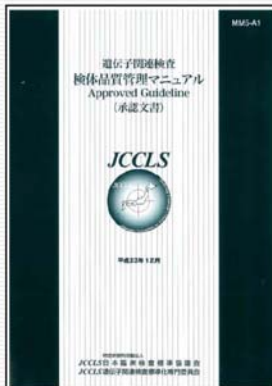
意見募集: 2011年11月25日まで

文書の構成

- 1 紹介
- 2 適用範囲および目的
- 3 ゲノムバイオマーカー特性
- 4 ゲノムバイオマーカー開発
- 5 マーカー性能
- 6 デバイス
- 7 潜在的な外部影響
- 8 その他
- 9 用語

©JMAC 2007-2012. All Rights Reserved

CONFIDENTIAL



発行: **JCCLS**日本臨床検査標準協議会

遺伝子関連検査における検体の採取、保管、運搬等の取扱いを定めた文書

遺伝子検査を施行する検査室の精度管理を主な目的とする。

特に**DNA, RNA**は分解しやすいため、検体の採取法から核酸抽出、検査にいたるプロセスについて標準的な手順を提示し、コントロールする。

遺伝子検査の標準化に向けた前進

DNAチップ関連の日本企業の動向

アンケート調査を実施
JMAC会員企業を中心に14社より回答

質問内容

- 1～3. 所属・氏名
4. 現在のチップ開発状況をお聞かせください。
5. 医療機器としての承認申請のご予定・計画をお聞かせください。
6. 医療機器申請で困っていることをお聞かせください。
7. 医療機器申請を行わない理由をお聞かせください。
8. ガイドライン作成に関する評価をお聞かせください。
9. ガイドラインに記載すべきとお考えの項目をお聞かせください。
10. ガイドラインに記載すべきでないとお考えの項目をお聞かせください。

アンケート質問事項(続き)



11. ガイドライン・国際標準化でメリットがあると思われる内容、項目をお聞かせください。
12. 国際標準化戦略と知財戦略の立案でお困りの点をお聞かせください。
13. 標準化・ガイドライン化についてはどの部署が担当しているかお聞かせください。
14. 業界で自主的に定める国際標準と当局規制に直結するガイドラインへの関与について戦略面でご意見があればお聞かせください。
15. 標準化・ガイドライン化において現場との調整で工夫している点をお聞かせください。
16. (キット中の)コントロール(陽性・陰性)開発でお困りの点をお聞かせください。
17. 標準物質の利用方法についてお考えのところをお聞かせください。
18. その他、ガイドライン・標準化について、コメントがありましたらお願いいたします。

回答内容ピックアップ(国内アンケート)



チップ開発状況について

- チップ等から得られたデータを用いた診断バイオマーカー探索研究開発に注力。将来的には得られたマーカーを検出する診断チップ等の開発の可能性。
- 客先より預かった試薬(DNA、ペプチド、タンパク等)の微量スポットによるアレイ試作
- ユニバーサルアレイ(共通プローブ)を用いた遺伝子検出法の開発
- 受託製造・受託解析等実施中。数種類のカタログアレイを市販。
- イネ病原菌検査チップ開発中
- ヒト遺伝子検査用チップ開発計画あり
- Affymetrix社マイクロアレイにて診断アプリケーションを開発中
- 研究用途において、スライドガラスサイズのDNAチップを開発後、新規のDNAチップ開発は停止中
- 開発していない、あるいは、遺伝子発現解析用は開発していない。

回答内容ピックアップ(国内アンケート)



ガイドラインに記載すべき事柄

- ガイドラインで定めた内容と、実施内容の差異や誤差がどの程度までなら問題ないのかの基準
- 評価の基準、用語の定義
- 用語の定義、感度／精度／安定性の評価方法、臨床性能試験方法、その他薬事申請に必須の項目
- アレイ性能の保証の方法
- 検査項目
- プローブの精度評価方法
- 搭載位置の保証、感度や再現性等、各種パラメータの具体的な測定方法。
- チップ使用期限
- 保管方法
- 診断用として用いるので、特にデータの安定性に関する事項
- 医療機器であればGMP製造を必須とすること
- チップメーカーにDNAを供給する立場であるため、ガイドラインはチップメーカーグループのコンセンサスが得られたものが前提となります。

回答内容ピックアップ(国内アンケート)



ガイドラインに記載すべきでない事柄

- 将来の開発の足かせにならないよう、具体的な数値規定は避け、定性的な表現に留める事が好ましい
- 性能、仕様の基準
- 特定企業の技術・製品にしか対応しない手法や基準
- On/Off等の結果の判定基準
- 数値解析の方法
- 使用装置のスペック
- マイクロアレイは多様な開発されてきているが、アプリケーションの目的によって品質評価の基準ややり方は違っていても構わないので、ガイドラインで一律に規定するのは望ましくない
- DNAチップに標準物質を搭載することを必須事項としない

回答内容ピックアップ(国内アンケート)



ガイドラインによるメリットがあると思う事柄

- ガイドラインの順守により、関連製品の品質アピールとなりうる。特に、塩基配列決定法との比較を含め、他の検出方法との比較によりDNAチップの位置付けを明確にし、差別化をすることができる。
- 遺伝検査技術の普及
- デバイス共通に利用できる試薬開発を促す項目
- 今後の製品開発、国際特許を含めた特許出願が行いやすくなる
- 評価の基準、用語の定義
- アレイを市販するに際して必要なチェック項目
- 測定結果の生データ表示方法
- プローブの名称
- 発現解析における、バリエーションの取り扱い
- ガイドラインに従って申請すると短期間で認可が取得できることを期待。国際標準では、プローブ配列のvalidation項目
- 診断・GMO検査などにおいて、指標を設定することが出来る
- 低精度・低品質商品の排除

回答内容ピックアップ(国内アンケート)



ガイドラインに対する要望等

- ガイドラインや標準化によって、アレイ等の製造方法が限定されてしまうようであると困ります。
- 我が国のマイクロアレイ産業が発展しない理由の一つとしては、試薬業者が限られていることにある。特にGMPグレードで製造される試薬がなければ、応用されるアプリケーション開発がままならない。
- 米国ではLDT(セントラルラボアッセイ)としてマイクロアレイの臨床検査応用が進んできている。単一施設での利用も想定したガイドライン化が求められる。
- DNAチップの素材となる製品の供給メーカーや製造受託会社といった、部分的に携わる事業形態をとる場合、特に、ガイドラインに対応することが事業継続において負担になる恐れがある。

国内企業アンケートまとめ



- 昨年実施したヒアリング同様、ガイドラインへの期待が寄せられた。
- 発現解析チップでは定量性が求められるため、開発が難しいと考えられており、各社興味をもっているものの開発中の企業少ない。
- 医療申請は前例もなく、認可へのタイムスパンが読めず対応が難しい。遺伝子検査の基準がなく、世界で活用されるための判断尺度がないことがハードルと感じられている。ガイドライン策定により、製造側の開発加速のみならず、審査側の審査期間短縮を期待している企業が多い。
- ガイドラインに従って申請することにより、許認可が加速されることが望まれているが、「あるべき姿」と実現可能性を勘案し、技術の進歩を妨げないような柔軟性のあるものを期待している。

ガイドライン作成に関する要望



- 各企業の一致した意見としては：
 - 普遍的、一般的な必要要件(評価項目や手順)を記載して欲しい
 - 細やかな規程、絶対値、具体的な数値基準は不要
 - 厳しすぎる規定は参入障壁になりかねず、また、緩すぎる数値は今後の技術開発の意欲を阻むものとなりかねず、数値限定は求められていない。
- 他に記載して欲しい項目：
 - 再現性(実検体で再現する系であるか否か)
 - 外部委託合成品(プローブ、標準物質等)の品質基準
 - 有効測定範囲
 - チップ品質の評価尺度
 - プロセス、レポートの記載項目
- 未承認の遺伝子検査を実費診療で行うケースが増加している。検査の質をどのように担保するかが今後の課題。

標準化関連の海外動向



SPIDIA事務局:キアゲン社(ドイツ)に設置
SPIDIAプロジェクトコーディネーター: Dr. Uwe Oelmuller
 (キアゲン社、プリアナリティクス社に所属)
 ヒアリング実施

SPIDIAの取組み

目的: 体外診断用の前処理ツール・プロセスの改善および標準化
 計画: 4年間の時限プロジェクト(2008-2012) 6か月間の延長申請中
 組織: 7公共研究機関、8民間研究機関、欧州標準化機構によるコンソーシアム
 予算: 1,300万ユーロ (ECから900万ユーロ)

具体的な取組内容

1. 体外診断用前処理の品質保証スキーム・ガイドラインの確立
2. 組織、血液サンプルの安定化をはじめとする技術革新
3. 管理面、倫理面における情報の流通、コンプライアンス確立

標準化関連の海外動向



SPIDIA 標準化の進捗状況

血液サンプルの評価
 DNA DNAPlas RNA RING Trial

Ring Trial Name	What do you receive?	What do you extract?	What does SPIDIA evaluate?
SPIDIA - DNA	Whole blood sample	Genomic DNA	Quality Quantity
SPIDIA - DNAPlas	Whole blood sample	Genomic DNA	Quality Quantity
	Plasma sample	Cell-free DNA	Quantity Integrity
SPIDIA - RNA	Whole blood sample	RNA	Quality Quantity Stability

血液サンプルの評価 RING TRIALにおける手順



Programme	手順	目標
DNA Ring Trial	参加ラボで血液、血漿からDNA抽出実施 プロトコル: 参加ラボ 光度分析実施	ガイドライン作成
DNApas Ring Trial	フィレンツェ大学ラボ as SPDIA LAB 光度分析計、real-time PCR、RNase P定量(DNA定量) キアゲン社ラボ as SPDIA LAB バルスフィールドゲル電気泳動(DNA純度) Isohelix Quality Check Kit(血漿DNA純度) Agilent DNA Kit(血漿DNA純度) Kineret software(増幅データ)	
RNA Ring Trial	参加ラボでRNA抽出実施 K2EDTA採血管(ベネトンディツキンソン社) PAXgene 採血管(プリアナリティクス社) フィレンツェ大学ラボ as SPDIA LAB 純度、トータル量(by高度分析計)、integrity (Agilent RIN値)、 転写産物測定(PCR)、マトリックス干渉測定(Kineret software)	ガイドライン作成

©JMAC 2007-2012. All Rights Reserved

CONFIDENTIAL

ARRAYIT CORPORATION(ヒアリング実施)



ヒアリング先: **Dr. Mark Schena, CEO**

- **1993年設立**
- マイクロアレイ作製および受託サービス
- スポットティング装置、スキャナー、タンパクアレイ、**DNA抽出キット開発**
- **OvaDx**子宮癌のスクリーニング検査を開発
- **2010年FDAのPMA承認を目指すことを公表**
- **IVDはLDTではなくFDA承認を目指すべき**



524 East Weddell Dr.
Sunnyvale, CA 94089
Website: <http://arrayit.com/>

PATHWORK DIAGNOSTICS(ヒアリング実施)



ヒアリング先: **Dr. David Craford, Chief Commercial Officer**

- **2008年Tissue of OriginがFDAのIVDMIA承認**
(多変量指数測定承認)
- アフィメトリクス基板を採用。**15種**の癌腫について原発組織を検出可能。
- **2010年Tissue of Originホルマリン包埋サンプル (FFPE)のFDA・IVDMIA承認**
- **2010年ノバルティス社と癌バイオマーカー探索で提携**を発表。
- **IVDMIA承認に続き、PMA承認を受けた。**
- **LDTによるIVDに反対。キットはFDA承認が必要。**



**595 Penobscot Dr.
Redwood City, CA 94063
Website: pathworkdx.com**

PHALANX BIOTECH GROUP



ヒアリング先: **Dr. Lester Lien, President US Office**

- **2004年設立**
- 安価な遺伝子発現解析用チップ開発
- 全ゲノム解析可能なチップを**99**米国ドルで販売。
(競合先は**160~250**ドル程度)
- 米国に加え、中国、台湾の市場を狙う。
- **MAQC**プロジェクト参加企業
- **FDA承認が難しくなったために戦略として、欧州CE**
マークを目指す企業が増えているようだ。



**1301 Shoreway Rd., Ste. 160
Belmont, CA 94002
Website:
www.phalanxbiotech.com**

BIOCARTIS SA



ヒアリング先:

Mr. Nader Donzel, Chief Technical Officer
Dr. Nicolas Demierre, Head of Engineering

- マイクロフルイディクス技術による診断、創薬
- **2010年**、**Royal Philips Electronics**社の診断プラットフォームを買収
- **PCR**、高温槽、**DNA**、**RNA**、メチレーション**DNA**実験に利用可能なプラットフォーム
- **2012**年中に研究用途、**2013**年中に臨床用途発表予定
- **Philips**社・**bioMerieux**社と提携し、同社プラットフォームを利用した診断法を共同開発中。
- **FDA**承認を目指し、既に事前相談フェーズに入っている。



BIOCARTIS SA
Scientific Parc EPFL, PSE-C
CH-1015 Lausanne
Switzerland
Website: www.biocartis.com

海外企業動向まとめ



- 訪問先の企業は、**LDT**よりむしろ**FDA**承認を受けた方がいいという立場であった。
- 欧州でも、**FDA**承認のための相談を実施していた。
- **RNA**標準物質について興味を示していた。
- **qPCR**や、次世代シーケンサーに比べても、ターゲット数や前処理の時間、膨大なデータなど課題も多く、**DNA**チップに期待がある。
- **FFPE**サンプルからの品質保証ができるのなら是非欲しい。
- バイオチップの市場競争力が出せるのは、安価である場合だけだと明言する会社もあった。
- 米国でも、保険金額と**DNA**チップを用いた診断薬の提供価格に乖離がある。

次世代シーケンサー(MAQC III/SEQC)状況



- **Sequencing Quality Control**は、次世代シーケンサープラットフォームの技術的再現性を測定・評価
- **2008年**より、参加企業を募集
- **2011年初頭**に**Association of Biomolecular Resource Facilities (ABRF)**が**FDA**に協力表明
データ公開→**2012年**予定
- **5プロジェクト**進行中
 - 1.ヒトのトランスクリプトームのアノテーション
 - 2.ラットのトランスクリプトームのアノテーション
 - 3.癌患者の生存を予測するシーケンス性能 **BGI**
(中国)およびケルン子供病院(ドイツ)が参画
 - 4.トキシコゲノミクス研究
 - 5.ファーマコゲノミクス研究

SEQC参加の11ラボ



プラットフォーム	ラボラトリー
イルミナ	イルミナ社
	BGI
	ウェイル・コーネル・メディカル・カレッジ
	メイヨークリニック
ライフテクノロジー社 SOLiD	ライフテクノロジー社
	ノースウェスタン大学
	ペンシルバニア州立大学
	SeqWright
Roche 454	Roche 社
	アンダルシアン・メディカル・ゲノム・プロジェクト
	ニューヨーク大学メディカルセンター
	SeqWright

次世代シーケンサー製品一覧



企業	技術・製品	仕様 その他
イルミナ社	Gene Analyzer Ilx	迅速なワークフローを採用し、2x 150bpのリード長と5億を超えるリード数
	HiSeq1000、2000シーケンシングシステム	1ランあたり540-600Gb ヒトゲノム30xカバレッジの高精度データを低コストで産出
	MiSeq	卓上型 リード長2x 150bp、ラン時間27時間、データ量1.5-2.0Gb
アプライドバイオシステムズ社・ライフテクノロジー社	SOLIDシステム フローセルを利用したパ ラレルシーケンシングプラ ットフォーム	SOLID5500xl 1日当たり20-30GbのDNAシーケンス可能。1回のランで、ヒトゲノム2人分、全エクソーム24人分、あるいは全トランスクリプトーム12人分を高い精度で解析することが可能。リード長75 bp、ナノビーズ技術1日30-45Gb、1ランで3人以上のゲノムを解析することができる。
ロシュ454ライフサイエンス社	Genome Sequencer FLX	リード長最長1,000塩基 リード数 約1,000,000リード ラン時間23時間
イオントレント社・ライフテクノロジー社	Ion PGM	水素イオン半導体チップ上の高密度アレイを用いた技術 高速シーケンス:3時間以内 ハイスループット:最大約1Gbのデータ量、500万-700万リード産出 リード数: <200bp
コンブリートジェノミクス社	Complete Genomics	開発したシーケンサーの販売はせず、受託サービスのみ DNA nanoballアレイと合成DNAを用いるライゲーション法
パシフィックバイオ社	PacBio RS	1分子リアルタイムシーケンシング(SMRT)技術 DNA合成をリアルタイムでモニタリング 最長で25kb、平均でも2000bの解析が可能であるとされる
ドーバーシステム社	Polonator G.007 第二世代シーケンサー	ハーバード大学医学部との共同開発。解析ソフトはオープンソース、試薬は市販されているものを組み合わせて使う。導入費用とランニングコスト低減を目指して開発されたもので、本体価格は17万ドル。ユーザーコミュニティによる改良を前提としているため、研究者が自分で工夫しなければならないことも多い。
ハルシオンモレキュラー社	透過型電子顕微鏡(TEM)を用いた技術	1000ドルゲノムプロジェクトから250万ドルの資金助成を得て開発された。
ヘリコスバイオサイエンス社	Helicos Genetic Analysis System Helicos Single Molecule Sequencer	1分子でシーケンスを行う 塩基読み取りは、化学的に塩基と切断可能な箇所に蛍光を付けてその蛍光を読み取る。 Virtual Terminatorと呼ばれる通り、蛍光読み取りごとに反応を止める。 リード長32塩基

まとめ



- 国内外ガイドラインの整備状況
 - FDAは、コンパニオン診断デバイス、ベネフィット・リスク評価基準のガイドラインなど、技術実用化に応じた各種ガイドラインが整備しつつあり、個別化医療の実現に向けた動きが活発。
 - バイオマーカーの取扱いについては、ICHが整い、薬事に対応してきている。
- FDA vs. CLIA
 - FDAは、CLIA法の下にあるLDTを管理したいという姿勢を一層強めている。コンパニオン診断薬のガイドライン草案もその布石。
- 日本におけるガイドライン整備
 - 日本においては、JCCLSの努力により、遺伝子検査に関連して、検体品質管理マニュアルが整備されたが、遺伝子発現解析用DNAチップの測定、核酸標準物質、外部精度管理等については、未整備であり、これらの整備が待たれるところである。

**特定非営利活動法人
バイオチップコンソーシアム
(JMAC: Japan MicroArray Consortium)**

3.2 「平成 23 年度委託研究遺伝子発現解析用 DNA チップ開発状況調査」最終報告書
特定非営利活動法人 バイオチップコンソーシアム

平成 2 3 年度委託研究

遺伝子発現解析用 DNA チップ開発状況調査

特定非営利活動法人 バイオチップコンソーシアム

目次

1. 調査概要.....	3
2. 新ガイドラインに関する調査.....	3
2.1 IVD コンパニオン診断デバイスに関するガイドライン	5
2.2 バイオマーカー適格性確認に関するガイドライン	10
2.3 ベネフィット・リスク評価に関するガイドライン	12
2.4 ゲノムバイオマーカーの臨床試験での利用に関するガイドライン	16
2.5 遺伝子関連検査 検体品質管理マニュアル	18
3. 標準化に関する国際動向調査.....	18
3.1 FDA/MAQC.....	18
3.2 EU/SPIDIA.....	26
4. 国内外 DNA チップ関連企業の製品開発に関する調査.....	32
4.1 国内企業アンケート調査結果.....	32
4.2 海外企業ヒアリング調査結果.....	37
5. 次世代シーケンサー開発動向に関する調査.....	51
6. DNA チップによる遺伝子診断の基盤研究	59
7. まとめ.....	63

1. 調査概要

遺伝子発現解析用 DNA チップ開発状況調査にあたり、昨年度の調査手法を応用した。国内外 DNA チップ関連企業、国内外標準化関連団体についてのウェブ調査、文献調査、アンケート調査、ヒアリング調査を通じて、DNA チップ関連開発動向、国内外標準化動向の取り纏めを行った。具体的には次の項目を実施した。

① 国内外 DNA チップ関連企業に対する製品開発の調査

国内 DNA チップ関連企業に対してアンケート調査を行い、市場動向、特許動向、開発の問題点、標準化が必要な技術内容などを把握した。海外企業に対しては、ヒアリング調査、文献調査、インターネット調査を行った。

② 米国 FDA/MAQC 及び欧州 EU/SPIDIA に関する動向調査

FDA/MAQC については文献調査を行った。EU/SPIDIA の動向については、プロジェクトリーダーへのヒアリング調査を実施した。

③ DNA チップによる遺伝子診断の基盤になる研究に関する調査

DNA チップ結果を用いて診断する可能性の高い遺伝子検査に関して、疾患と診断・治療の内容、研究状況、診断に関する技術的情報に関して文献、インターネット等、既存情報の調査を行った。

2. 新ガイドラインに関する調査

昨年度の調査委託において、以下のガイドラインについて報告を行った。（表 1）ここでは、昨年度報告以降に新規に発表された遺伝子発現解析用 DNA チップの開発に関係を及ぼすと思われるガイドライン（表 2）について報告する。

表 1 昨年度（平成 22 年度）報告したガイドライン及び関連活動

地域	ガイドライン	時期	内容等
欧州	SPIDIA プロジェクト	2008-	前処理過程の標準化
米国	MAQC I and II	2005-	マイクロアレイ測定の標準化
	RT-PCR 用前処理ガイドライン	2005	Class II Special Controls Guidance Document; RNA Preanalytical Systems (RNA Collection, Stabilization and Purification Systems for RT-PCR used in Molecular Diagnostic Testing)
	IVDMIA ガイドライン	2007	Draft Guidance for Industry, Clinical Laboratories, and FDA In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assays (IVDMIA)
	乳がん予後予測ガイドライン	2007	Class II Special Controls Guidance Document; Gene Expression Profiling Test System for Breast Cancer Prognosis 2007
	PGx データ提出ガイドライン	2007	
	遺伝形質の分子遺伝学的検査のための GLP	2009	Good Laboratory Practices for Molecular Genetic Testing for

			Heritable Disease and Conditions
日本	遺伝子型検定用DNAチップ (経済産業省)	2007	テーラーメイド医療用診断機器 (DNAチップ) 開発ガイドライン -遺伝子型 (ジェノタイピング) 検定用DNAチップに関して-
	遺伝子型判定用DNAチップ (厚生労働省)	2008	次世代医療機器評価指標の公表について -DNAチップを用いた遺伝子型判定用診断薬に関する評価指標-
OECD	分子遺伝学的検査における質保証に関する OECD ガイドライン	2007	OECD GUIDELINES FOR QUALITY ASSURANCE IN MOLECULAR GENETIC TESTING
ISO	GMO 検出	-	Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived products
	マイクロアレイ解析	2010-	NWIP - CD : General definitions and requirements for microarray detection of specific nucleic acid sequences

表2 平成22年度報告以降に発表されたガイドライン

地域	ガイドライン	時期	内容等
米国 FDA	IVD コンパニオン診断デバイス	2011 年 7 月 14 日	Draft Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff In Vitro Companion Diagnostic Devices <i>DRAFT GUIDANCE</i>
米国 FDA	医薬品またはバイオテクノロジー応用医薬品の開発におけるバイオマーカー: 適格性確認のための資料における用法の記載要領、資料の構成及び様式	2011 年 8 月 10 日	Guidance for Industry E16 Biomarkers Related to Drug or Biotechnology Product Development: Context, Structure, and Format of Qualification Submissions
米国 FDA	医療機器の市販前承認申請におけるベネフィット・リスク評価時に考慮すべき因子	2011 年 8 月 15 日	Draft Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff - Factors to Consider when Making Benefit-Risk Determinations in Medical Device Premarket Review
欧州 EMA	ゲノムバイオマーカーの臨床試験での利用に関する草案	2011 年 7 月 12 日	Reflection paper on methodological issues associated with pharmacogenomic biomarkers in relation to clinical development and patient selection
日本 PMDA	ICH E16 医薬品またはバイオテクノロジー応用医薬品の開発におけるバイオマーカー: 適格性確認のための資料における用法の記載要領、資料の構成及び様式	平成 23 年 1 月 20 日	上記の FDA による 2011 年 8 月 10 日付けのガイダンスの日本版
日本 JCCLS	遺伝子関連検査 検体品質管理マニュアル (承認文書)	平成 23 年 12 月	遺伝子関連検査における検体の採取、保管、運搬等の取扱いを定めた文書

2.1 IVD コンパニオン診断デバイスに関するガイドライン

2.1.1 文書名

Draft Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff
In Vitro Companion Diagnostic Devices DRAFT GUIDANCE

2.1.2 発行

U.S. Department of Health and Human Services
Food and Drug Administration

医療機器・放射線保健センター Center for Devices and Radiological Health (CDRH),
生物学的製剤評価研究センター Center for Biologics Evaluation and Research (CBER),
医薬品評価研究センター Center for Drug Evaluation and Research (CDER), FDA

2.1.3 記載内容

コンパニオン診断薬に依拠する治療薬の開発者および治療薬に対応したコンパニオン診断薬を開発しようとする者を対象としたガイダンスであり、次の目的が上げられている。（第2章より）

1. コンパニオン診断薬の定義
2. FDA がコンパニオン診断薬を管理する理由を説明
3. FDA 承認義務の明確化
4. 可能な市販前承認パスウェイへの誘導
5. 医薬品の安全性有効性を確実にするためにコンパニオン診断薬の併用を必要とする旨の表示に関する法的承認要件を提示

本ガイダンスの中で、FDA は IVD コンパニオン診断デバイスを次のように定義付けた。

- “IVD コンパニオン診断デバイス” とは、対応する治療薬の安全で効果的な使用のため、下記の目的にとって必須であるもの。
 - ・特定の治療薬によって利益を享受されると考えられる患者を同定する。
 - ・特定の治療薬による治療の結果、重大な副作用のリスクが増大すると考えられる患者を同定する。
 - ・安全性と薬効を向上させるための、治療の最適化（スケジュール、ドーズ、中断）を目的とした治療に対する反応のモニター

本ガイダンスには、FDA が FDA のスタンスとして将来的にいわゆる臨床ラボ検査 LDT (Laboratory Developed Test) を FDA の管理下に置きたいとする方針が見てとれる。第3章の中に、本ガイダンスには臨床ラボ検査を含めないとあり、臨床ラボ検査は医師に治療薬の有効性について役立つ情報をもたらすが、その情報は治療薬の安全性と効能について決定する因子ではないと記述がある。そのような IVD の例として、生化学検査（血清中のクレアチニン、トランスアミナーゼなど）を挙げている。つまり、コンパニオン診断薬に相当するものは、LDT レベルではなく、より直接的に治療薬

の安全性と効能について決定する因子を持つものであり、FDA が管理するものである、との主張が感じられる。

以下に第 3 章より、IVD コンパニオン診断デバイスの定義と利用について、さらに、第 4 章より、可能な市販前承認パスウェイの誘導について、詳述する。

【IVD コンパニオン診断デバイスの定義と利用について（第 3 章より）】

IVD コンパニオン診断デバイスは体外診断デバイスであって、対応する治療薬の安全と効果に必須の情報を提供するものである。特定の治療薬に対する IVD コンパニオン診断デバイスの利用は、診断デバイスと対応する治療薬の表示にその利用方法が規定されていなければならない。治療薬の後発品についても同様である。

IVD コンパニオン診断デバイスは対応する治療薬の利用に安全と効果に必須とされるものでなければならない。

- ・特定の治療薬によって利益を享受されると考えられる患者を同定する。
- ・特定の治療薬による治療の結果、重大な副作用のリスクが増大すると考えられる患者を同定する。
- ・安全性と薬効を向上させるための、治療の最適化（スケジュール、ドーズ、中断）を目的とした治療に対する反応のモニター

FDA は、この定義に臨床ラボ検査（LDT）を含めない。LDT には治療薬の利用に関して、医師に対して有用な情報を提供しよう意図されているが、その情報は治療薬の安全性と効能について決定する因子ではない。

理想的には、治療薬と対応する IVD コンパニオン診断デバイスは同時に開発されるとよい。治療薬の開発プログラムのデータを利用して開発する IVD コンパニオン診断デバイスの臨床的性能と臨床的有意性は裏打ちされたものとなる。但し、FDA は、同時開発が常に可能ではないことも認識している。特定の治療薬の安全的効果的利用をサポートする IVD コンパニオン診断デバイスは、新規の体外診断デバイス（新規解析物への新規検査など）であるかもしれないし、異なる企業によって作られた既存のデバイスの新バージョンであるかもしれない、また、他の目的で既に承認された既存のデバイスであるかもしれない。第 4 章で、IVD コンパニオン診断デバイスの利用による治療薬の FDA の承認に関する方針の概要を説明する。

【IVD コンパニオン診断デバイスと治療薬のレビューおよび承認について（第 4 章より）】

IVD コンパニオン診断デバイスと治療薬の申請については、適用可能な規制の要件に従って、レビュー、承認を行う。IVD コンパニオン診断デバイスの申請は、米連邦食品・医薬品・化粧品法（Act）および関連デバイス規程の下にデバイス部門の管理下でレビュー、承認を行う。治療薬の申請は Act（医薬品製品）セクション 505 または公衆衛生法（生物学的製品）セクション 351 および関連医薬品、生物学的製品の規制の下にレビュー、承認を行う。FDA は、対応する治療薬との関連性において各 IVD コンパニオン診断デバイスのレビューを行う。検査と治療薬の組み合わせの FDA レビューは関連 FDA 部署で相互に協力して行う。

A. 新規治療薬

新規治療薬には、治療薬の安全的効果的利用をサポートするための IVD コンパニオン診断デバイスが同時に開発され承認申請することが推奨される。IVD コンパニオン診断デバイスによる検査結果は、治療薬の安全的効果的利用に必須でなければならない。また、その利用について、治療薬の表示にも規定されていなければならない。（例えば、IVD コンパニオン診断デバイスと共に利用されたときのみ治療薬は安全で効果があるとされる等。）治療薬の承認前に、FDA は IVD コンパニオン診断デバイスが正しく検証され、安全性と有効性の基準を満たしているかどうか、治療薬の表示に示された十分な同等性があるかどうかを評価する。IVD コンパニオン診断デバイスは一部の例外を除いて（次章参照）、IVD コンパニオン診断デバイスの表示が承認されなかった場合は、FDA は新規治療薬を承認したり、IVD コンパニオン診断デバイスの利用について新規治療薬への表示について承認することはない。IVD コンパニオン診断デバイスの承認・認可はデバイスが十分に評価され、想定する患者に対して、十分な性能特性があることを示す。

B. IVD コンパニオン診断デバイスの承認のない治療薬の承認について

FDA は、IVD コンパニオン診断デバイスがその利用の表示の承認・認可がないものであっても、治療薬について承認を行うのが正しいという判断を行うこともある。2つのシナリオを示す。一般的に、治療薬が IVD コンパニオン診断デバイスの承認・認可がなくても承認されるとすれば、FDA は、IVD コンパニオン診断デバイスが正式な手続きを通して、次に承認・認可の申請が予定されているものとする。治療薬の表示に IVD コンパニオン診断デバイスの利用が表示されるよう変更が予定されているものとする。加えて、FDA は IVD コンパニオン診断デバイスのない治療薬の利用によって、安全性の問題があるときは追加の防止策が必要であるかどうかを考慮する。

1. 新規治療薬が生命の危険のある疾患に向けたものである場合

FDA は IVD コンパニオン診断デバイスの承認・認可の有無にかかわらず、治療薬の認可を考慮する。当該治療薬が生命の危険のある疾患を治療するために開発されたものであり、他に満足な選択肢が存在せず、IVD コンパニオン診断デバイスの承認・認可の有無にかかわらず、当該治療薬のベネフィットが IVD コンパニオン診断デバイスの未承認・未認可のリスクを上回ることが自明な場合である。

2. 既存の治療薬の場合

FDA は、一般的に既存の治療薬に対しては、IVD コンパニオン診断デバイスが承認・認可されるまでは、その利用について治療薬に規定の表示を行うための補足に対して承認を与えることはしない。しかし、FDA は既存の治療薬の表示が安全性の問題について改訂されるべきであり、その中に未承認・未認可の IVD コンパニオン診断デバイスの利用の規定について言及しなければならない事例があることを認識している。このような条件下では、未承認・未認可 IVD コンパニオン診断デバイスの利用によるベネフィットが、承認・認可済みデバイスの不在によるリスクを上回ることが自明な場合、FDA は IVD コンパニオン診断デバイスの承

認・認可が行われるまで、既存の治療薬の表示の変更についての承認を伸ばすような意図はない。

C. 一般的な方針

治療薬の安全的効果的利用が、IVD コンパニオン診断デバイスの利用に依存するのであれば、治療薬が承認されるときは、承認・認可済みの IVD コンパニオン診断デバイスが入手できる状況であるべきである。FDA は治療薬開発者が、その治療薬開発プランに承認・認可済みの IVD コンパニオン診断デバイスの利用が必要性を盛り込むことを期待する。治療薬開発者自ら自身の IVD コンパニオン診断デバイス開発を決定してもよい。また、診断デバイス開発者と協同してもよいし、既存の IVD コンパニオン診断デバイス（自社、他社含む）を修正することでもよい。次に示す一般的な方針は、IVD コンパニオン診断デバイスが同一のあるいは異なる事業者によって開発、製品化されるに関わらず、適用する。

- ・ FDA は、全ての医療デバイスと同様に、IVD コンパニオン診断デバイスの承認プロセスについて、リスクベースのアプローチを適用する。従って、承認プロセスは患者へのリスクのレベルによって変わる。IVD コンパニオン診断デバイスが想定する用途や、安全性・有効性を正当に保証するのに必要なコントロールに基づいて行う。リスクのレベルに応じて、リスクを軽減するコントロールとともに、当該 IVD コンパニオン診断デバイスが市販前承認あるいは 510k 承認のいずれとなるかが決まる。FDA は IVD コンパニオン診断デバイスの開発者に早期の相談を推奨する。FDA の市販前承認のレビューは、想定した用途について十分な性能特性を当該 IVD コンパニオン診断デバイスが備えているかどうかを評価する。

- ・ B に記述した状況を除き、治療薬と IVD コンパニオン診断デバイスのレビューを終了して、両製品の承認・認可が相応しいと判断されれば、FDA は両製品の同時に承認・認可を与えることを考慮している。FDA は開発者に対し、同時承認を円滑化するための開発と市販前承認申請のスケジュールを図ることを強く推奨する。

- ・ 既に IVD コンパニオン診断デバイスが合法に市販されていても、新規治療薬について、メーカーは新しい用途に IVD コンパニオン診断デバイスを適用する意図があるときは、FDA はこれを安全性や効果についての新しい疑問を生じる恐れのある重大な変更とみなし、新規治療薬に対する新しい IVD コンパニオン診断デバイスの用途とみなして、対処する。従って、新規治療薬に対する新しい用途として、正当な市販前申請（PMA か 510k のいずれ）がなされなければならない。

- ・ 新しい IVD コンパニオン診断デバイスが、承認・認可済みの既存の IVD コンパニオン診断デバイスと同様に使用されるときも、PMA あるいは 510k の正当な承認・認可を受けなければならない。

2.2 バイオマーカー適格性確認に関するガイドライン

2.2.1 文書名

Guidance for Industry E16 Biomarkers Related to Drug or Biotechnology Product
Development: Context, Structure, and Format of Qualification Submissions

医薬品またはバイオテクノロジー応用医薬品の開発におけるバイオマーカー：適格性確認のための資料における用法の記載要領、資料の構成及び様式（最終ガイダンス）

2.2.2 発行

ICH 日米 EU 医薬品規制調和国際会議

2.2.3 記載内容

ICH（日米 EU 医薬品規制調和国際会議）として発行されたものであり、日本でも同年 1 月 20 日に既に発行されており、文書全文は、PMDA のウェブサイトで照会できる。

http://www.pmda.go.jp/ich/e/e16_11_1_20.pdf

目的：本ガイダンスの目的は、ゲノムバイオマーカー適格性確認にあたり、規制当局提出資料への用法記載要領、資料の構成、様式に関する推奨事項を示すことである。規制当局・申請者の議論を促進させ、ICH 規制地域間で利用可能である国際共通化資料コモン・テクニカル・ドキュメント（CTD）の利用を提示している。

適用範囲：適用範囲はゲノムバイオマーカーとされているが、但し、ゲノム以外のバイオマーカーにも適用可能とし、プロテオミクス、イメージング、ゲノムとゲノム以外のバイオマーカーの組み合わせにも有効である。

一般原則：本ガイダンスでは、推奨される文書の形式を紹介している。これは、CTD モジュールの利用を促している。

セクション 1	各地域の行政情報	CTD モジュール 1
セクション 2	概要	CTD モジュール 2
セクション 3	品質に関する文書	CTD モジュール 3
セクション 4	非臨床試験報告書	CTD モジュール 4
セクション 5	臨床試験報告書	CTD モジュール 5

バイオマーカーの適格性確認に関する提出資料の構成

セクション1 各地域の行政情報	関係規制当局により規定される
セクション2 概要	◎ バイオマーカーの適格性確認に関する総括評価 ◎ 以下に示す総括資料（適切な場合） ○ 分析法に関するデータ ○ 非臨床のバイオマーカーに関するデータ ○ 臨床のバイオマーカーに関するデータ
セクション3 品質に関する文書	◎ バイオマーカーの適格性確認のための試験で用いる治験薬の構造、製造方法、品質特性（利用可能な場合）
セクション4 非臨床試験報告書	◎ 分析法の開発に関する報告 ◎ 分析法のバリデーションに関する報告 ◎ 非臨床試験報告書（in-vitro） ◎ 非臨床試験報告書（in-vivo、種を特定すること）
セクション5 臨床試験報告書	◎ 分析法の開発に関する報告 ◎ 分析法のバリデーションに関する報告 ◎ 臨床薬理試験報告書 ◎ 臨床の有効性及び／または安全性に関する試験報告書

2.3 ベネフィット・リスク評価に関するガイドライン

2.3.1 文書名

Draft Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff – Factors to Consider when Making Benefit-Risk Determinations in Medical Device Premarket Review

医療機器の市販前承認申請におけるベネフィット・リスク評価時に考慮すべき因子（ドラフト）

2.3.2 発行元

Department of Health and Human Services Food and Drug Administration

医療機器・放射線保健センター Center for Devices and Radiological Health

生物学的製剤評価研究センター Center for Biologics Evaluation and Research

2.3.3 記載内容

市販前承認申請において、FDA がベネフィット・リスク評価時に考慮する因子について例を挙げて説明を行っている。これは、市販前承認申請において、FDA がベネフィット・リスク評価時に考慮する因子について初の情報公開となった。医療機器の PMA 承認・510k 承認のために、承認プロセスの透明性を明らかにし、産業界に承認を奨励する内容となっている。「安全性データ」と「効果データ」を使用することにより、「安全性データ」はリスク対策上、メーカーのリスク低減能力を審査

するものとして、「効果データ」はベネフィットの考慮であり、デバイスによりリスクを上回るベネフィットが得られるかを審査する。

また、そのデバイスの新規性も評価対象となる。これまでに治療法のない疾患に対して初の技術である場合にこれを考慮する。第5章では、ベネフィット・リスクの評価例を具体的なデバイスを例にとって、詳述している。さらに Appendix には、ベネフィット・リスク評価用のワークシートを提供している。市販後のデータ公開もありうるとし、承認プロセスの透明化を図る内容となっている。

以下に第4章より、FDA がベネフィット・リスク評価時に考慮する因子について、詳述する。

【FDA がベネフィット・リスク評価時に考慮する因子（第4章より）】

(4.1) デバイスの効果を評価する方法

ベネフィットは次の因子によって評価される。

因子：ベネフィットの種別

患者マネジメントの向上、患者の死の危険回避、患者の満足度を向上させるという大きなインパクトを持つことのみならず、患者マネジメントの向上、機能不全の恐れを減少すること、軽度の症状の緩和などもベネフィットに含まれる。ベネフィットは、疾患の広がり具合のインパクトによって測ることができるかもしれない。その他のベネフィットには疾患の早期発見や薬剤応答性のある患者の同定などが挙げられる。

因子：患者のベネフィットの大きさ（マグニチュード）

ベネフィットの大きさ（マグニチュード）はベネフィットのサイズで測る。一般的にベネフィットは特定のエンドポイントや基準に沿って測定されている。数値の上下やエンドポイントの改善・悪化に照らして、患者のベネフィットの大きさを決定することができる。

因子：患者がベネフィットを享受する可能性

ベネフィットは対象とする患者群の一部にしか与えられていないかもしれないし、全体に与えられているかもしれない。あるいは、異なったサブグループの患者が異なったベネフィットや、程度の違う同じベネフィットを享受しているかもしれない。

因子：効果の持続（患者にどのくらいの時間ベネフィットが持続するかどうか）

疾患を根治する治療は患者の寿命中、繰り返しが必要なことがある。根治を目指す処方では繰り返しが前提となっている処方より、大きなベネフィットを有していなければならない。そのような処方が繰り返されたときは、より大きなリスクとなり、繰り返すごとにベネフィットは縮小する。

(4.2) デバイスの安全性の測定する方法

リスクおよび有害事象は、次の因子によって評価される。

- ・ デバイス使用による有害事象の数量、重大性、有害事象の種類

✓ デバイスによる重大な副作用・・・生命の危険を及ぼすけがや疾患を招くこと。生涯における障害やダメージなどを引き起こすこと。身体への有害事象を防ぐための外科的介入があること。

✓ デバイスによる重大ではない副作用・・・デバイスの利用によることが明らかであるが、重大な副作用には属さないもの。

✓ デバイス利用の手順によるものあるいは間接的な有害事象・・・患者への重大あるいは重大ではない副作用を与える有害事象およびデバイスの利用による直接的ではない結果。

- ・ 有害事象の可能性・・・有害事象を経験する患者の割合
- ・ 有害事象の持続期間・・・デバイスにより一時的・軽微な有害事象が起こる期間、回復するが元に戻せる有害事象が起こる期間、永久的に元に戻らない有害事象
- ・ 診断の false-positive、false-negative によるリスク・・・診断デバイスが false-positive の結果を生じたとき、患者は不要な治療を受け、その治療にともなうリスクに晒される。また、重大な疾患と不正確に診断されることがある。診断デバイスが false-negative の結果を生じたときは、患者は効果的な治療を受けることがなく、想定されるベネフィットを享受できない。また、正しい診断を受けることができない。

我々は、デバイスの利用により生じうる異なるタイプの有害事象の数量と重大性を考慮した。複数の有害事象が同時に起きるときは、重大性が増す。例えば、単独で起きるときは軽微な有害事象でも他の事象と重なることにより患者に重大な影響を及ぼすことになる。

(4.3) デバイスのベネフィット・リスクを増減する他の因子

● 不確かさ

デバイスの正当な安全性と有効性を評価するとき、100%の確かさはあり得ず、リスクを上回るベネフィットを示すこともない。しかし、ベネフィット・リスクを評価するとき、デバイスのベネフィットとリスクの確かさの度合いは重要な因子となる。例えば、ベネフィットが大きいと仮定されるとき、デバイスの承認に際し、リスクの非確実性は承認を支持する因子として受け入れられるだろう。一方で、臨床試験デザイン、試験の実行、解析が乏しい因子は信頼性のない研究データを生じてしまう。さらに、研究結果の反復性、同様の研究の結果、あるいはこの種で初めての研究あるいは単独の研究であるかどうかは、全て確かさのレベルに影響を及ぼす。加えて、想定した治療や想定したユーザーへの臨床試験結果の一般化可能性は重要である。例えば、もしもデバイスがユーザーのトレーニングや専門化を必要とするのなら、試験結果は医師全般に拡大して解釈することができない。同様に、デバイスがある疾患のサブグループを特定するものであれば、患者全般に拡大して解釈することはできない。

● 疾患の特徴付け

治療、診断の条件、疾患の兆候、どのように患者に影響するのか、どのように診断された病態が治療されるのか、病態の罹患歴と進行（患者にとって良くなっているのか悪くなっているのか）は、全て疾患の特徴付ける際に重要な因子である。

- 患者のリスク許容

リスクが同定できず、定義できないときは、患者毎にリスク許容の程度が違いただろう。診断デバイスは、診断された病態の治療の有効性と本質が患者のリスク許容に影響を及ぼす。また、次のような因子も患者のリスク許容に影響を及ぼす。

- ・ 疾患の深刻性・・・重篤な疾患を罹患する患者はリスクを伴うデバイスを治療に用いることを許容する。診断デバイスは、重篤な疾患を罹患する患者には false negative のリスクに対して、さらに悪影響を与えることになる。
- ・ 疾患の慢性度・・・慢性の疾患の患者によっては、疾患を許容し、日常生活への支障を最小限に止めようとし、リスクの許容は積極的ではない。リスクを伴うデバイスには大きな効果を期待する。長年にわたり、慢性の疾患により少しずつ消耗している患者は、少しのベネフィットを得るために高いリスクを許容するかもしれない。
- ・ 治療法・診断法の選択肢の存在・・・もしも他に治療法・診断法がなければ、患者はベネフィットを得るためによりリスクを許容する。

- 治療法・診断法の他の選択肢の存在

ベネフィット・リスク評価において、FDA は非デバイス製品を含んだ上で、他に治療法・診断法の選択肢が存在するか、想定された条件と患者に対して承認を受けたかどうか、どの程度効果的かどうか、どのリスクをもたらしたかを考慮する。承認済みデバイスのどの非承認部分が用いられたのか、他の製品、手法が可能なかどうか、もしも他に承認されたデバイスや製品がない場合はどうか、ベネフィット・リスクのプロファイルを考慮する。例えば、新規デバイスが少しのベネフィットしかなく、ベネフィットについて明らかな不確かさがある場合も、FDA は他に治療法・診断法の選択肢がなく、リスクプロファイルが許容範囲である場合は、承認を与えることがある。

- リスク軽減

リスク軽減を正しく利用するときは、有害事象の起きる可能性を縮小できる。一般的にリスク軽減の形態は、表示に警告を含むことである。または、より限定された使用方法に表現を制限することである。リスク軽減で最も考慮すべきは、有害事象に対処するのに必要な介入の種類である。ある有害事象は、外科手術を要する。他は、軽微な介入でよいかもしれない。従って、高い有害事象の可能性とリスクによる有害事象が重大であっても、非侵襲的治療で軽減することがある。いくつかの有害事象は、デバイスの更新によって軽減されることもある。

- 技術の新規性

新規の技術が搭載されたデバイスで、特に初めての技術投入の場合は、最適化されたベネフィットより、ベネフィットが少ないことがある。しかし、以前には存在しなかった利点を提供することがある。何度も反復することによりデバイスのベネフィット・リスクプロファイルは向上し、安全性および有効性のレベルも向上し、最新バージョンは、従来品より大きな利点をもたらすことがある。我々はこのような環境にあるときは、従来技術によって一般に許容されるリスクよりもリスクが高く、ベネフィットが少ないデバイスでも承認を与えることがある。

特に、供給者や患者が限られた選択肢しかない場合、患者が最先端の技術にアクセスできる機会を与えたいと考える。

2.4 ゲノムバイオマーカーの臨床試験での利用に関するガイドライン

2.4.1 文書名

Reflection paper on methodological issues associated with pharmacogenomic biomarkers in relation to clinical development and patient selection

ゲノムバイオマーカーの臨床試験での利用に関する草案（ドラフト）

2.4.2 発行

欧州医薬品庁（EMA）

2.4.3 記載内容

欧州においても、2011年3月、欧州医薬品庁（EMA）より、ゲノムバイオマーカーのリフレクションペーパーが公表された。ファーマコゲノミックバイオマーカーについての草案である。内容は、ゲノムバイオマーカー（GBM）の利用に際し、ステークホルダー（出資者・利害関係者）が考慮しなければならない原則を浮き彫りにすることとし、特に、患者選択および臨床試験の方法における手法を示している。ゲノムバイオマーカーを薬剤有効性予測（Predictive GBMs）と予後予測（Prognostic GBMs）に区分しているが、このペーパーの中では、single marker および multimarker signature の知見等については独立したテーマとし、outside of scope（対象外）としている。

ゲノムバイオマーカー利用の注意点として、第3章4項に普通のバイオマーカーと異なり、DNA、RNA、たんぱく等を試料として使用するための複雑さ、すなわち、前処理（サンプル収集の一貫性、サンプル処理、アッセイ法、分類上のミス）の問題に言及している。ラボラトリー（セントラルまたはローカル）の施設間差は、臨床試験の信頼性そのものをなくす。シングルラボの利用は、ミスの確率を下げるが、確実とは言えない。また、DNAのジェノタイピングは、堅牢な分子マーカーであるけれども、mRNAバイオマーカー（トランスクリプトーム）については、生物学的にも実験的にもバリエーションがあるとし、paired サンプルを用いて再現性を確認するべきとしている。トランスクリプトーム解析の結果は常に他の独立したmRNA定量、たんぱく定量が行われるべきであり、生理的有意差（physiological significance）は、厳格な統計学的プロセスを経るべきとある。

ゲノムバイオマーカーの開発に当たっては、exploratory development（探求的開発）と confirmatory development（確証的開発）に分類して述べ、後者では臨床試験デザイン（無作為試験 RCT）について手法を説明している。

第6章は、ゲノムバイオマーカー評価のためのデバイス・診断キットの項目である。ゲノムバイオマーカーを調べるアッセイ法は市販されているものもあるが、それでは疾患の種類や治療が限られ、評価も既に受け入れられたアッセイや方法に限られてしまう。新規マーカーや特定のマーカーには薬剤の開発と並行して、特定のアッセイやキットが必要となる。これは薬剤に対するコンパニオン診断薬の同時開発に当たる。また、市販されているアッセイ法の感度（sensitivity）、特異度

(specificity)に関連する諸問題は、考察が必要である。ゲノムバイオマーカーを評価する他のアッセイや検査テスト（一般にホームブリューテスト、自家検査と言われるもの）においても同様の考慮が必要である。このドラフトの意図は、市販の検査テストやキットの性能の議論にあるわけではないとされているが、次の点が上げられている。

- 薬剤開発において、コンパニオン診断薬の同時開発を盛り込むことは可能であろう。特定の診断キットや診断法が主試験で採用された時に、それがゲノムバイオマーカーの同定／定量に固有のものであれば、その特定の検査法とゲノムバイオマーカーの価値をリンクさせることが必要であろう。HER-2 過剰発現の同定・定量において、免疫組織化学法 IHC あるいは FISH 法を用いることは一例として上げられる。このような例では、薬剤の表示によりこの情報を結果の明細の一部として提供できる。他の例には、Daco 社の検査とセツキシマブ（抗癌剤）や Monogram 社の Trofile アッセイとマラビロク（エイズ薬）がある。
- ゲノムバイオマーカーの同定に用いられるテストの内でも、ゲノムバイオマーカーのために特別に開発されたものでないもの（例、CYP2D6 多型の同定）は、薬剤表示対象とはならない。また、特定の診断キットの開発を期待するものでもない。
- 臨床試験で用いられたアッセイ・検査テストは使用せず、その代わりに新規または異なる検査を利用することがある。このような場合は、臨床試験のアッセイと市販のバイオマーカー測定検査の同等性を証明すること。同様の市販検査についても重要な考察点であるが、この議論はペーパーの現在のスコープには該当しない。

2.5 遺伝子関連検査 検体品質管理マニュアル（承認文書）

2.5.1 文書名

遺伝子関連検査 検体品質管理マニュアル（承認文書）

2.5.2 発行

JCCLS 日本臨床検査標準協議会

2.5.3 記載内容

遺伝子関連検査における検体の採取、保管、運搬等の取扱いを定めた文書であり、遺伝子検査を施行する検査室の精度管理を主な目的とする。特に DNA, RNA は分解しやすいため、検体の採取法から核酸抽出、検査にいたるプロセスについて標準的な手順を提示し、コントロールする。遺伝子検査の標準化に向けた前進となる。

3. 標準化に関する国際動向調査

3.1 FDA/MAQC

3.1.1 IVDMA ガイダンス最終案の見送り（FDA）

多数の遺伝子の発現解析や複数のたんぱく質の発現をアルゴリズム化する IVDMA（体外診断多変量指数測定）ガイダンスの最初の案は 2006 年に公表され、2007 年に第 2 案が発表された。その後、

FDA は最終案を発表するとしていたが、急速に普及している LDT (Laboratory-Developed Tests、検査所で独自に開発され行われている検査) 発の体外診断薬 (IVD) について、FDA 規制の枠組みに組み入れるべく、2011 年の IVDMA ガイダンスの最終案は見送りとなり、その代わりに全 LDT の FDA 規制について集中することになった。

IVDMA はそもそも体外診断薬の中でも複雑かつ高度な分類に属する一部のものであり、その領域だけを規制することは却って体外診断薬市場に混乱を生じさせているという判断である。

3.1.2 FDA の対 LDT 規制の動向

米国では、体外診断薬 (IVD) の公的承認として、FDA 制度に基づくものとメディケア・メディケイド・サービス・センター (CMS) に基づくものが存在し、混乱している。

いわゆる LDT (Laboratory-Developed Tests、検査所で独自に開発され行われている検査) という方式で、これまでの歴史もあり、一般的に広く実施されている。所轄官庁は CMS であり CLIA (臨床検査機関改善修正法) の規制を受ける。文字通り、検査機関の評価であり、この規制には臨床評価は含まれていない。

これに対して、FDA 制度において、IVD (体外診断薬) は診断用として利用される検査キットを対象としており、510k と呼ばれる比較的簡易に登録できる制度と PMA (Premarket Approval) と呼ばれる市販前審査の制度がある。これらは検査キットの性能 (臨床評価) を審査するものである。

これまでは、細胞や細胞核を染色し、顕微鏡で外側から観察して検査結果を出すことが LDT の対象であったため、特に多くの問題を引き起こすことがなかった。しかし、近年、細胞核内の遺伝子レベルの分子診断法などの急速な発展により、LDT の枠組みで誕生した体外診断薬が検査キット化され、一般的に普及する一方で、これらが FDA の IVD の規制を受けないという事象が発生しており、FDA ではこれを憂慮するという事態となっている。

これを受け、2011 年 7 月に FDA では、LDT および IVD 規制に関するパブリックミーティングを開催した。報道によると、FDA の IVD に関する包含的規制の意向に対し、参加者コメントには賛否両論が展開されたということである。

【ネガティブな意見】

- ✓ 検査所は伝統的にデバイスの製造者ではないために、全 LDT に対し、医療機器規制のパラダイムを当てはめるには検査所の負担が大き過ぎる。実際に検査所として検査が実施できないケースや開発中の LDT も中断されるケースが想定される。

- ✓ FDA に期待するのは既に臨床応用されている大多数の支持を得ている LDT 検査は適用を除外されるべきである。

【ポジティブな意見】

- ✓ FDA 承認のために投資してきた企業サイドは賛成を示した。どこで検査が開発されたというのではなく、検査結果が正しくないときなどに起こりうる患者へのリスクの度合いに基づく規制のスキームが必要である。

3.1.3 FDA の方針

FDA は現在の医療機器における 3 つのクラス分類に LDT を包含する意向を示している。具体的な内容はまだ示されていない。

FDA の LDT 規制での象徴的な例が、乳癌の遺伝子発現を利用した診断法である。オランダの Agendia 社は FDA 承認を取る方向を選択し、同社の 70 遺伝子による遺伝子発現解析による乳癌予後予測検査「マンマプリント」を申請し、IVDMIA（体外診断多変量指数測定）の承認第一号（2007 年 2 月）となった。同社の検査所は CLIA による承認も受けており、CLIA 法にも準拠している。

一方、米国においてマンマプリントよりも商業的に成功を納めている乳癌の 21 遺伝子遺伝子発現による再発予測検査「オンコタイプ」は FDA 承認を取る意向はなく、開発企業の Genomic Health 社はこれまでに FDA から承認申請の義務はないことを確認している。

マンマプリントとオンコタイプは競合関係にあるが、受けている規制の背景が違うという矛盾が米国内に生じている。FDA ではさらに有識者会議を開催している。FDA の立場は、LDT の臨床評価をいかに強化していくかという点にある。FDA としては、現行リスク分類の見直し、未承認検査に対する LDT 規制の段階的導入、NIH との承認システム構築の共同、支援してもらえそうな外部機関のリストアップを進めたいとしている。

FDA は LDT と IVD のリスクベースによる分類の構築を目指しており、CMS とも共同し、現行の CMS の規制部分とコンフリクトしない形の規制を作り、LDT に対する規制強化を図っている。

米国先進医療技術工業会（AdvaMed）は、白書の中で次の提案を行っている。

1. 検査所は全て CLIA 法と品質基準の要求を満たさなければならない。
2. FDA は全検査の安全性と効果について監督する。
3. FDA の規制は検査のリスクに比例した要求レベルでなければならない。
4. 稀病に対しては規制すべきでない。
5. FDA は CMS との重複を避け、強調したものを作成すべき。
6. FDA は CMS と協調し、新検査に対してタイムリーかつ十分に承認の意義があるものでないといけない。

AdvaMed は、FDA がこれらの検査の監督をすべきという立場を取っているが、現行の多くの検査については FDA 規制を免除されてもいいとしている。それらは既に確立したバイオマーカーであり技術的にも成熟しているとしている。さらに、患者に対するリスクの低い検査や稀病の検査については免除されること、これらはむしろ CLIA の監督を受けるべきだと指摘している。

AdvaMed は、4 層のリスク分類についても提案している。第 0 層（低リスク）から第 3 層（高リスク）とし、新規バイオマーカー、新規検体、新規用途、新規アルゴリズムの有無によって FDA の技術レビューを受けることにするというものである。また、どの技術に基盤を置いているか、同様の技術のレビュー経験が FDA にあるか、検査のリスクの安全性・効果について十分な科学的根拠があるか、さらに検査結果が正しくない場合の患者の被害のレベルについて、をリスク分類の因子とする。

米国病理医協会（CAP）は、FDA に対し、臨床評価の検証については、米国臨床検査標準委員会（CLSI） 疾病対策センター（CDC）および CAP との連携を提案している。

公聴会とパブリックコメント（2010 年 8 月 15 日まで募集された）における民間からのコメントは産業界のそれぞれの立場や現実の臨床現場の声であり、2011 年 8 月には、FDA からガイダンス草案「Factors to Consider when Making Benefit-Risk Determinations in Medical Device Premarket

Review（医療機器の市販前承認申請におけるベネフィット・リスク評価時に考慮すべき因子）が発表された現在も現場（市場）の声は変わらない。

3.1.4 FDA / MAQC-II

MAQC-II 論文の反響については中々現状を把握するのが難しく、情報が収集できなかったが、MAQC-II プロジェクトリーダーの Dr. Leming Shi が 2012 年 3 月に来日し、標準化について講演する機会があるので、その折りの報告に期待したい。ここでは、繰り返しになるが、MAQC-II プロジェクトのまとめである論文 Nature Biotechnology 28, 827–838 (1 August 2010) から引用を行う。

【DISCUSSION より】

MAQC-II は、一般的なコミュニティにおいて遺伝子発現ベースの予測モデル開発が、どのように行われているのか観察研究を行った。マイクロアレイ遺伝子発現プロファイリングは生物医学研究において最も利用されているツールである。実験を通して得られた高次元データの解析は複数のステップといくつかのクリティカルな決定ポイントを経てなされており、結果の健全性に大きな影響を与えている。健全な内部バリデーションの重要な要件は、その反復の中に特徴選択とパラメーター最適化を含むことであり、予測性能の過剰な最適化を避けなければならない。このことがどの程度、マイクロアレイ解析を行う科学コミュニティの中で行き渡り、踏襲されているのかまだ知られていない。同一のデータが使用されたにも関わらず、一研究者グループが発表したデータを他の研究者グループが行うと確認されないという懸念が持ち上がって来ている。結果を確認できないいくつかの理由に起因しており、次のようなことが起きている。

(i) どの解析を実際に使用したのかを示す手順の十分な情報がない。(ii) データ処理（正規化、遺伝子フィルタリング、特徴選択）が過度に複雑で、再現性を得るための充分な記述がない。(iii) 不正確あるいはバイアスのある複雑な解析方法

関連する懸念は、ゲノムのデータが、たとえ探索用のデータセットで再現性があっても、独立のバリデーションで補外されない予測モデルを生成することがあることである。MAQC-II プロジェクトはこれらの懸念に関するまたとない機会を提供した。特筆すべきは、我々はデータ解析チームにモデル構築方法に制限をおかなかったことである。従って、チームは様々に異なったモデリング法を取った。例えば、特徴選択方法は様々なバリエーションがあり、統計有意差の検定から機械学習アルゴリズム、発現値の差に依存するもの、エンドポイントに関連した想定される生物学的なメカニズムの知見を利用するもの、等である。予測アルゴリズムもまた様々なバリエーションがあった。異なるモデルでチーム間の内部バリデーション性能結果を比較するため、我々は 5 重のクロスバリデーションを 10 回繰り返す用法を利用し、モデルの内部性能を推測することを推奨した。しかし、全チームがこれに厳格に従ったわけではなかったので、我々には内部バリデーション方法を調査することもできた。解析プロトコルの多様性は、現在研究で用いられているプロトコールと極めて類似しており、現実を反映している。モデリング因子が探索される空間（space）という意味合いにおいては、MAQC-II は無作為割付や統制された実験というよりむしろ現行の実務の調査であるといえる。そのため、結果を理解するには注意を要する。例えば、数チームは、他のモデリング因子と混同してモデルのデータの消失を引き起こし、全エンドポイントを解析しなかった。全体として、MAQC-II 候補モデルを推薦するのに取られた手順は、独立したデータセットを使用したバリデーションの際に正当に機能するモデルを選択

するのに極めて効果的である。しかし、一般的に選択されたモデルはトレーニング時ほどバリデーション時には機能しないといえる。バリデーション時の性能の低下は、内部バリデーション性能にのみ依存しているのではないという重要性を示しており、各判別器 (classifier) を少なくとも一回外部バリデーションにかけなければならないことを示している。多数推薦されたモデル中の 13 候補モデルは、大勢の専門家の協力の下にピアレビューを通して選択された。(データ解析チームは 13 モデルの内、1 つしか登録できないため) 非常に長い時間を要した。モデルは過剰に最適化されやすくなっているものの、候補モデルの内部および外部性能の数値は、モデル全体のセットの内部および外部性能の数値よりもより一致していた。レビューは信頼できるモデルの特徴の同定に生産的 (productive) であった。MAQC-II を通じて得た重要な教訓は、特徴選択およびモデル開発においてどの段階においても、その決定項目について、レトロスペクティブ (回顧的) に回収したり、文書化することはほとんど不可能だということである。モデル構築プロセスの完全な記述の欠落は、異なる解析チームが他のチームの結果を完全に再現することができない共通した理由だといえる。そのため、判別器構築プロセスの詳細な文書化は煩雑であるけれども、我々は電子媒体にモデル構築と評価プロセスを補足資料として全ゲノム関連の論文発表に付けることを推奨する。MAQC-II は新手法を実行するためのソフトウェアが予想通り機能することを証明したベンチマーク (基準) として、将来利用することができる 13 エンドポイントの 6 データセットを利用可能にした。

これらのデータセットに対して、ソフトウェアにベンチマーク (基準) を合わせることは、新データセットの予測モデル開発のために十分に mature な (成熟した) ソフトウェアであることを潜在的ユーザーに保証することができる。モデリングアプローチと性能評価プロセスが健全であることを確認する助けとなる代替手段を開発するのにも、公共データベースでこの情報を捉えるプロセスを同定するのにも有利である。MAQC-II のプロジェクトで得られた知見は、同一のデータセットが多数のデータ解析チームに供与された時、たとえ異なるモデル構築法が取られても、同一の結果を生成できることを見出した。これは研究毎にも一致しており、良質のデータおよび十分な情報量のある特徴があるとき、正しく利用されれば、大抵の判別法は同一の予測性能を生み出すことが分かった。これはまた個人グループの小データセットについてのレポートについても確認できた。レポートでは、いくつかの異なる項目選択方法と予測アルゴリズムがそれぞれ特徴のある多くのモデルを生成することができるが、これらが統計学的に同一の性能を持つと主張している。これらの結果は、バイオインフォマティクスの文献に多数発表されている全体像を提示する。文献では、多変量予測モデル構築プロセスの様々なステップを検証し、信頼性のある結果を得るためにクリティカルな要素を同定している。

MAQC-II で、重要であるのに事前には過小評価であった考察に、異なる臨床エンドポイントによって、判別困難レベルが全く異なることである。いくつかのエンドポイントは現在入手可能なデータで十分にロバストなモデルを生成できるが、他のエンドポイントになると現在入手可能なデータでは高度な予測モデルを生成することは難しい。MAQC-II プロジェクトの一環として行われた解析で、乳癌データに関するものは、これらの点について詳細に実証している。MAQC-II プロジェクトで扱ったいくつかの臨床的意義のあるエンドポイントについて、遺伝子発現データは臨床的共変量単独によるモデルは有意に差が出ることはなく、ヘテロジーニアスな群の患者の予後を予測することの困難さと遺伝子発現データと臨床共変量を結合する必要がある可能性を浮き彫りにした。臨床サンプルのアノテーション情報の正確性は、バリデーションサンプルの正確な予測結果を得る困難さにおいて、影響を及ぼして

いるかもしれない。例えば、ほとんど全てのモデルで数サンプルが間違って分類されている。エンドポイント H や L のポジティブコントロール中にも数サンプルにおいても誤分類が起きている。神経芽細胞腫患者の臨床情報（そのポジティブコントロールのエンドポイント L が画一的に誤分類された）を再チェックしたところ、8 症例の 3 名の性別が間違って記載されていた。他の MAQC-II 関連論文ではより詳細な解析を紹介している。判別器の臨床的ベネフィット、予測性能への異なるモデリング因子のインパクト、客観的なマイクロアレイ・クロスプラットフォーム予測評価、クロスティシュー予測、一色法 対 二色法の予測比較、遺伝子シグニチャーの機能解析、k 近傍法に基づくシンプルでロバストなデータ解析プロトコルの推奨等。例えば、我々は 478 個の神経芽細胞腫サンプルの一色法と二色法の遺伝子発現プロファイルからの判別性能を体系的に比較したところ、どちらのプラットフォームも同等の判別性能を持っていた。これは新しく生成された一色法のデータセットは、未知のサンプルに対する k 近傍法ベースのシンプルなデータ解析プロトコルの応用性を評価するために用いられた。加えて、MAQC-II Genome-Wide Association Working Group はジェノタイピングコーリングの実験的あるいはアルゴリズム上の要因によるばらつきを評価した。要約すると、MAQC-II プロジェクトは、多変量遺伝子発現に基づく臨床的予後予測を開発するために利用されている現在のモデルは、本コンソーシアムのほとんどの解析チームによって、正しく利用されていることを実証した。しかしながら、能力差が出現し、このためにロバストな分析方法の正しい実行の重要性を強調している。MAQC-II データセットの解析に基づく考察は、他の疾患にも応用できる。MAQC-II データセットは、公共的に入手できる。正しいモデリング実践を確実なものとするためのベンチマークとして、我々はサイエンスコミュニティで利用されることを願っている。MAQC-II での経験を通して、臨床的誤分類の問題が予測困難さの度合いを増し、このことが mRNA 量と関連づけて考慮されるという問題を強調しておきたい。我々は DNA microRNA たんぱくや代謝物レベルの他の生物学的データを包含することが、臨床的に関連のあるエンドポイントをより正確に予測する能力を高めることを期待する。MAQC-II による good modeling practice ガイドラインおよび教訓（前例のないコラボレーションによって得ることのできた）は、堅牢な根拠を提供した。堅牢な根拠から、医療目的のために、他の高次元生物学データを信頼性を持って用いることができるのである。

3.1.3 FDA /MAQC-III の動向

FDA の MAQC-III は別名 SEQC、正しくは Sequencing Quality Control であり、次世代シーケンサープラットフォームの技術的再現性を測定・評価している。MAQC そのものは Microarray Quality Control として、2005 年よりマイクロアレイプラットフォームの再現性評価のために開始したプロジェクトであるが、2008 年頃より、マイクロアレイの評価に加え、次世代シーケンサー評価するため、参加企業を募集した。2011 年初頭に Association of Biomolecular Resource Facilities（日本では ABRF と呼称）が FDA に協力を表明し、同年中のデータ公開を目指した。

現時点で 11 サイトが次世代シーケンサー評価に参加している。（表 3）

(表 3) SEQC 参加ラボ

プラットフォーム	ラボラトリー
イルミナ	イルミナ社
	BGI
	ウェイル・コーネル・メディカル・カレッジ
	メイヨークリニック
ライフテクノロジーズ社 SOLiD	ライフテクノロジーズ社
	ノースウェスタン大学
	ペンシルバニア州立大学
	SeqWright
Roche 454	Roche 454
	アンダルシアン・メディカル・ゲノム・プロジェクト
	ニューヨーク大学メディカルセンター
	SeqWright

RNA-seq の再現性を Roche/454、Illumina、Life Technology SOLiD の 3 プラットフォームで評価する。最初のデータは 2012 年春頃に公表される見通しである。使用されている RNA リファレンスは、MAQC の初期プロジェクトで使用されたものと同じのものを用いている。当初、最初のデータを 2011 年中に公表できる予定であったが、計画期間が当初より時間を労し、翌年 2012 年春の公表へとずれこんだ。なお、シーケンス後の生データは 20 施設の統計解析サイトに送付され、処理されることになっている。

プロジェクト自身は、シーケンシングのプラットフォーム毎に 3 つの技術グループに分けられており、各グループには 4 つのラボが振り分けられている。各プラットフォームにおける差を 4 ラボで比較検討できる体制を敷いている。同一プラットフォームのシーケンシングは各サイトで標準手順書に従って実施し、同一条件下での比較が可能となるようにする。

現在、11 サイトで実施しているが、数サイトが追加実験実施への参加を表明している。(イルミナプラットフォームに対し 7 サイト、SOLiD に対し 4 サイト、Roche454 に対し 3 サイト) FDA が最も普及している次世代シーケンサー 3 機種で実験しているのに対し、ABRF が PacBio RS (パシフィックバイオサイエンス社) や Ion Torrent PGM (ライフテクノロジーズ社) などの新機種の評価を担当している。

SEQC ではプロジェクトが発展的に進化しており、次世代シーケンサーについてはさらに 5 つの FDA 主導プロジェクトが進行している。1 つ目はヒトのトランスクリプトームのアノテーション、2 つ目はラットのトランスクリプトームのアノテーションである。これらのプロジェクトはヒトゲノム中の全遺伝子についての堅固なアノテーションを構築することである。

3 つ目のプロジェクトは、癌患者の生存を予測するシーケンス性能があるかどうかを評価するものである。本プロジェクトには BGI (中国) およびケルン子供病院 (ドイツ) が参画しており、神経芽腫患者 500 サンプルを用い、バイオマーカーを評価している。

4 つ目、5 つ目のプロジェクトは、トキシコゲノミクス研究とファーマコゲノミクス研究で、それぞれラットで化合物間の発癌性の差を見るものと、アーミッシュ族のエクソームシーケンシングを用いて治療効果を予測するものである。

これらの研究プロジェクトの目的は、次世代シーケンシングによる信頼性のある定量的測定方法を利用するためであり、アノテーション構築、医療における予後予測、トキシコ、ファーマコゲノミクスの理解が進むことが期待されている。

現状としては、これらのサテライトプロジェクトは主としてイルミナプラットフォームが用いられている。データ発表の時期は示されていない。

SEQC の初期目標は、定量的測定が可能かどうかのプラットフォーム検証とプラットフォーム間差の検証である。評価の結果、研究用途における価値が認められた一方で、シーケンサーの販売企業はより臨床応用（医療市場）を目指しており、これらへの対応がより重要度を増している。臨床用アプリケーションについては、分子診断法、シーケンシング法のいずれも十分に堅固な再現性を持たせなければならない。そのために SEQC プロジェクトでは、標準手順書（Standard Operating Procedures）の構築を重要な目標に掲げている。

標準手順書により、前処理におけるノイズ、バイオインフォマティクスによるノイズを除去したいとしている。

3.2 EU/SPIDIA

3.2.1 SPIDIA の動向

ニュースレター等で入手できる情報を元に、今回の委託調査においては、直接ヒアリング実施を試みた。SPIDIA のプロジェクトリーダーは Dr. Uwe Oelmüller であり、SPIDIA プロジェクトについての対外発表を一手に引き受けていることから、氏に面談を要請したところ、快諾を得た。Dr. Oelmüller は、キアゲン社 Vice President R&D であり、SPIDIA 事務局は、キアゲン社内（ドイツ・ヒルデン市）に構えている。その際に聞き取った情報を報告するとともに、巻末には、Dr. Oelmüller より提供を受けた面談時に使用した資料を添付する。

【ヒアリング先】

Dr. Uwe Oelmüller, Vice President R&D, QIAGEN

Dr. Ralf Wyrich, Senior Scientist R&D, QIAGEN

Dr. Daniel Grolz, Scientific Associate Director R&D, QIAGEN

【ヒアリング内容】

- ・ SPIDIA は、産業団体ではなくアカデミックな集合体である。研究費を配分してプロジェクトを実施している。プロジェクトは 2008 年にキックオフした。2012 年の 9 月に 4 年間のプロジェクト期間を終了するが、6 ヶ月間のプロジェクト延長を希望している。

- ・ プロジェクトの目標は、診断の前処理工程における標準化である。血液、腫瘍組織などの検体は、どのような条件で保管されたかによって、検査の数値が変わってくる。さらに、検査実施者の技量によっても差がある。このようなブレに対して、まずヨーロッパ域内でのコンセンサスを取ろうとしているのが SPIDIA である。

- ・ CEN（欧州標準化委員会、European Committee for Standardization）もプロジェクトに参加しているが、そのまま ISO の DIS (Drafted International Standard) に提出できるわけではない。また、CEN が現時点で ISO への提出の予定があるのかどうかは把握していない。

- ・ アメリカや日本とのコラボレーションについては、GEN が一度そのような働きかけを行ったようにも聞いている。アメリカと日本とどちらかと言えば、日本のほうが組みやすいとも考えている。
- ・ アメリカとは実際に NIH や CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) とコラボレーションを行っているが、SPIDIA の成果が直ちに FDA に採用されることはなく限定的である。政治的な色合いが濃く、SPIDIA はサイエンスの結果を出すことに集中している。
- ・ 切除した腫瘍組織等を病理用と分子診断用と取り分けてクロスリンクのない保管の実現に取り組んだ。その結果、PFPE (PAXgene-fixed and paraffin embedded) という方法の開発に成功した。成果は論文になっている。Kap, M; Smedts, et al. Histological Assessment of PAXgene Tissue Fixation and Stabilization Reagents, PLOS ONE. 2011; 6(11)
- ・ 血液保管法のプロジェクト (RING TRIAL) については、最新の結果が論文にアクセプトされた。まもなく、オープンになるが現時点では結果を紹介できない。
- ・ 血液中には、どのような疾患の情報も必ず入っていると考えている。そのために血液の保管法を開発したいと考えている。フリーDNA、フリーRNA 等。検査の対象によって必要な DNA の長さが変わってくることも考慮したい。
- ・ 体外診断薬においては FDA 規制が厳しくなりつつあり、CE マークの IVD を優先する米国企業等が増えていることは認識している。CE マーク IVD は LIST A LIST B その他の分類があるが、臨床試験が不要であり、規制するよりむしろ自由にさせている。CE マークが今後、FDA のような厳格化を行うということは特に予定されていないと思う。
- ・ 血液用 PAXgene (採血管) は FDA510k を受けている。アプリケーションとしては RT-PCR のみに使用可能となっている。かつて、Affimetrix, Agilent, Illumina の DNA マイクロアレイ向けのアプリケーション用として、FDA510k を通す話を持ちかけたが、各社とも乗ってこなかった。(理由は不明)
- ・ 同様に QIACUBE、QIACymphony についても FDA 承認を受けている。SPIDIA では 2012 年 9 月から 2013 年 3 月に (プロジェクト最終の) 国際会議を予定しているので日本からも参加してもらえると嬉しい。
- ・ 今後も気軽に質問等に応じたい。交流を続ける旨を確認した。

3.2.2 SPIDIA の枠組み

SPIDIA は、体外診断薬の前処理工程における標準化の不足箇所の補足および改善のために発足した大規模集約型の 4 年間の期限プロジェクトである。SPIDIA の研究・標準化活動はエビデンスベースのガイドライン構築から検査の前処理工程におけるツールの構築までの全工程をカバーしている。さらに新規アッセイ法や新規バイオマーカーの開発を通して、これらのツールの最適化を目指している。コンソーシアムは 7 つの公的研究機関、8 つの研究企業と欧州標準化団体 (CEN) が参加して構成されている。SPIDIA の予算は 1300 万ユーロ (約 13 億円) の内 EC による費用が 900 万ユーロ (約 9 億円) である。

3.2.3 プロジェクトの目的

体外診断薬の医療における役割の増大とともに核酸、たんぱく、代謝物などの分子生物プロファイルを利用した技術が進化を遂げている。しかしながら、これらサンプルの輸送中、保管中における変質が劇的に検査結果を変えてしまうことが多くの臨床研究を通じて明らかになってきた。信頼性・再現性のある結果で診断目的にも採用させるには、サンプル収集、サンプル取扱、固定化、保管などサンプルに伴う新しい技術のためのガイドラインの充実が不可欠である。SPIDIA プロジェクトでは、ガイドライン、品質保証スキーム、革新的前処理ツールを提供することによりこれらのギャップを充足することを目的としている。

3.2.4 SPIDIA のアプローチ

SPIDIA では3つの活動を展開している。一つには体外診断薬の前処理工程用のガイドラインおよび品質保証スキームを全欧州規模で進めること。RING TRIAL のエビデンスベースに基づく文書作成を進めるものであり、前処理工程の問題点を解明する。特に組織、腫瘍、全血、血清、血漿サンプル由来のDNA、RNA、たんぱく、代謝物をターゲットに据えている。さらに、品質保証用のバイオマーカーを発見することであり、このバイオマーカーを用いて、臨床バイオサンプル収集後の人工的改変を検出できるようにする。

二つ目のテーマは、体外診断薬の前処理工程における弱点を強化する革新的技術の統合である。新旧のデータを活用できるようにする。組織、血液、非侵襲的サンプル（綿棒による取得サンプルなど）の複数の前処理工程を自動化で一連に処理できる安定した技術の開発を含む。三つ目のテーマは、SPIDIA の知見の普及活動である。倫理面・コンプライアンスの普及を含む。

3.2.5 SPIDIA 成果

組織・血液サンプル固定化・安定化技術の評価、組織サンプルの前処理ワークフローの評価、組織サンプルの評価（メタボロミクス解析用）、分子診断用血液サンプル前処理フェーズの標準化、サンプル品質管理用バイオマーカーセットの同定、ヒト血液サンプル処理のワークフロー開発、バイオマーカー探索用前処理ツール・ガイドラインの検証実験、前処理ワークフローのガイドライン開発等について、論文発表、学会発表を行っている。特に、組織・血液サンプルの固定化・安定化技術の評価において、PFPE(PAXgene-fixed and paraffin embedded) PAXgene 固定パラフィン包埋が、FFPE（ホルマリン固定パラフィン包埋）よりも優れた方法であることを発表している。さらに、たんぱく質レベルで調べた結果、PAXgene Tissue System を用いた処理が、凍結サンプルと同等の結果を与えることを示した。

3.2.6 プロジェクト進捗状況

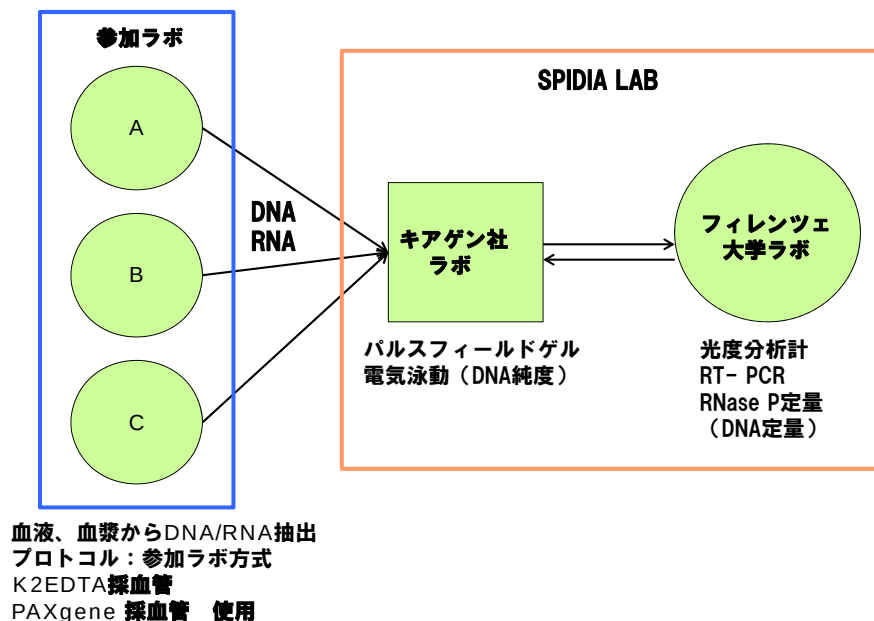
【RING TRIAL】

RING TRIAL は、ヨーロッパにおける前処理工程の標準化の現状を解析するために実施されており、生体（ヒト）由来のサンプルのハンドリング、固定化について臨床研究を行っているものである。EFCC (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) が参画している。これまでに欧州 30 カ国の 219 ラボから 322 アプリケーションが集積されている。データは近く論文発表される。（2012 年 2 月時点）

血液サンプルの評価（RING TRIAL）における手順

Programme	手順	目標
DNA Ring Trial DNAplas Ring Trial	参加ラボで血液、血漿から DNA 抽出実施 プロトコル：参加ラボ方式 光度分析実施 フィレンツェ大学ラボ as SPDIA LAB 光度分析計、real-time PCR、RNase P 定量 (DNA 定量) キアゲン社ラボ as SPDIA LAB パルスフィールドゲル電気泳動 (DNA 純度) Isohelix Quality Check Kit (血漿 DNA 純度) Agilent DNA Kit (血漿 DNA 純度) Kineret software (増幅データ)	ガイドライン 作成
RNA Ring Trial	参加ラボで RNA 抽出実施 K2EDTA 採血管 (ベネトンディッキンソン社) PAXgene 採血管 (プリアナリティクス社) フィレンツェ大学ラボ as SPDIA LAB 純度、トータル量 (by 高度分析計) integrity (Agilent RIN 値) 転写産物測定 (PCR) マトリックス干渉測定 (Kineret software)	ガイドライン 作成

RING TRIAL 前処理プロセス構成図



血液サンプルの評価 (DNA DNAPlas RNA RING Trial)

Ring Trial Name	What do you receive?	What do you extract?	What does SPIDIA evaluate?
SPIDIA - DNA	Whole blood sample	Genomic DNA	Quality Quantity
SPIDIA - DNAPlas	Whole blood sample	Genomic DNA	Quality Quantity
	Plasma sample	Cell-free DNA	Quantity Integrity
SPIDIA - RNA	Whole blood sample	RNA	Quality Quantity Stability

SPIDIA 対外発表

学会名	ポスター内容	著者の所属等	結果、キーワード等
2011 欧州病理学会議	臨床組織検体のタンパク発現における固定遅延の影響について	ミュンヘン工科大学、グラーツ医科大学など	ヒト肝サンプルから様々なタイムポイントでタンパクを測定。同一サンプルにおけるタイムポイント差は観測できず。
2011 欧州病理学会議	組織中の生分子、形態モルフォロジーの同時保存の新技术	グラーツ医科大学、プリアナリティクス社、ミュンヘン工科大学など	PAXgene Tissue System の利便さが証明された。凍結サンプルと同等の数値が可能
2011 ドイツ病理学会 Deutsche Gesellschaft für Pathologie	プロテオーム解析のための PAXgene 固定組織、パラフィン包埋組織の評価	ミュンヘン工科大学、ヘルムホルツセンターなど	PAXgene の有効性、RNA 保存においては、FFPE をはるかに凌ぐ値を測定できた。
2011 Biospecimen Research Network (NCI)	PAXgene 固定組織：モルフォロジー、核酸の同時保存用の新技术	プリアナリティクス社、キアゲン	(ホルマリン固定に対して) PAXgene 固定のパラフィン包埋が優れた保存方法
2011 Biospecimen Research Network (NCI)	ヒト組織サンプルにおけるタンパク品質の前処理条件の考察	ミュンヘン大学、グラーツ医科大学など	プロテオームは冷虚血後 60 分以内では安定である。(変化が少ない)
2010 AMP meeting	全血からの自動化電磁ビーズによる miRNA 濃縮法 SPIDIA によるプロトコル提案	キアゲン、AROS バイオテクノロジー社、プリアナリティクス社	small RNA, miRNA 抽出方法確立、RIN 値は not best tool、全自動化システム QIAAsymphony 検証
2010 BBMRI Meeting BBMRI (Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure)	組織中のモルフォロジー、生分子の同時保存の方法	オーストリアグラーツ医科大学、キアゲン、ダコ・デンマークほか	組織用 PAXgene はモルフォロジー、生分子保存に有効な方法

4. 国内外 DNA チップ関連企業の製品開発に関する調査

診断に向けた DNA チップ開発、あるいは関連の技術開発について、国内外のメーカーにアンケート調査、ヒアリング調査を実施し、開発状況、医療機器申請への対応、ガイドラインに関する評価、標準化項目等について情報を収集し、実用化に向けた動向を調査した。

4.1 国内企業アンケート調査結果

国内企業に対しては、JMAC 会員企業を中心にアンケート調査を実施し、以下の 14 社より回答を得た。

- ① 三菱レイヨン株式会社
- ② 株式会社東芝
- ③ 東レ株式会社
- ④ 日本ガイシ株式会社
- ⑤ 株式会社 DNA チップ研究所
- ⑥ エスシーワールド株式会社
- ⑦ シスメックス株式会社
- ⑧ 株式会社カケンジェネックス
- ⑨ ライフテクノロジーズジャパン株式会社
- ⑩ 株式会社ファスマック
- ⑪ 株式会社ベックス
- ⑫ 日本ゼオン株式会社
- ⑬ 大日本印刷株式会社
- ⑭ 株式会社ジェネティックラボ

質問項目

- ① DNA チップ開発状況について
- ② 医療機器としての承認申請の予定・計画
- ③ 医療機器申請で困っていること
- ④ 医療機器申請を行わない理由
- ⑤ ガイドライン作成に関する評価
- ⑥ ガイドラインに記載すべきと考える項目
- ⑦ ガイドラインに記載すべきでないとする項目
- ⑧ ガイドライン・国際標準化でメリットがあると思われる内容、項目
- ⑨ 国際標準化戦略と知財戦略の立案でお困りの点
- ⑩ 標準化・ガイドライン化についてはどの部署が担当しているか
- ⑪ 業界で自主的に定める国際標準と当局規制に直結するガイドラインへの関与について

戦略面

- ⑫ 標準化・ガイドライン化において現場との調整で工夫している点
- ⑬ (キット中の) コントロール(陽性・陰性) 開発でお困りの点
- ⑭ 標準物質の利用方法について
- ⑮ その他、ガイドライン・標準化について、コメント

4.1.1 DNA チップ開発状況について

イネ病原菌検査チップ開発、ヒト遺伝子検査用チップ開発、ユニバーサルアレイ（共通プローブ）を用いた遺伝子検出法の開発、試薬（DNA、ペプチド、タンパク等）の微量スポットによるカスタムアレイなどチップ開発の他、アジレント社、アフィメトリクス社の基板を用いた診断アプリケーション・バイオマーカー開発を行っている等、診断用目的の DNA チップ開発を行っている企業が多くみられた。一方で、研究用途において、スライドガラスサイズの DNA チップを開発後、新規の DNA チップ開発を停止した企業や遺伝子発現解析用チップは開発していない企業もあった。

4.1.2 医療機器としての承認申請の予定・計画

14社の内、申請を検討中としたところが1社、既に医療機器登録済みとしたところが1社あった。

4.1.3 医療機器申請で困っていること

解析装置が届出だけで済む医療機器の扱いであっても DNA チップは大臣承認が必要な体外診断用医薬品となっており、認可までの時間が読めないという意見、保険点数（2000点）がハードルになっている、薬事法担当の人材がない、経験がない等の意見、さらに中小企業であるために申請にかかる費用と時間のコストが見合わない等の意見があった。

4.1.4 医療機器申請を行わない理由

こちらは未回答のものが多かった。現状ではその段階に達していないという意見が1社あったが、現状を反映していると思われる。

4.1.5 ガイドライン作成に関する評価

10社の回答にガイドライン作成を歓迎する意の意見があった。審査時の評価対象となる基準や要件が明確になるという点、そのことにより審査基準に合わせたマイクロアレイの開発や応用が進むという点、市場拡大が進むという点に集約された。残りの4社についてはマイクロアレイを直接開発していない企業等であったため、未回答であった。

4.1.6 ガイドラインに記載すべきと考える項目

7社からの回答があった。重複する回答を避けると、以下のとおりであった。

- ・ 評価の基準、用語の定義、感度／精度／安定性の評価方法、臨床性能試験方法、その他薬事申請に必須の項目
 - ・ アレイ性能の保証の方法
 - ・ プローブの精度評価方法
 - ・ 搭載位置の保証、感度や再現性等、各種パラメータの具体的な測定方法
 - ・ チップ使用期限、保管方法
 - ・ 診断用として用いるので、特にデータの安定性に関する事項
 - ・ 医療機器であれば GMP 製造を必須とすること

4.1.7 ガイドラインに記載すべきでないと考ええる項目

6社からの回答があった。重複する回答を避けると、以下のとおりであった。

- ・ 将来の開発の足かせにならないよう、具体的な数値規定は避け、定性的な表現に留める事が好ましい
- ・ 性能、仕様の基準
- ・ 特定企業の技術・製品にしか対応しない手法や基準
- ・ On/Off 等の結果の判定基準
- ・ 数値解析の方法
- ・ 使用装置のスペック
- ・ マイクロアレイは多様な開発されてきているが、アプリケーションの目的によって品質評価の基準ややり方は違っていても構わないので、ガイドラインで一様に規定するのは望ましくない
- ・ DNA チップに標準物質を搭載することを必須事項としない

4.1.8 ガイドライン・国際標準化でメリットがあると思われる内容、項目

9社からの回答があった。重複する回答を避けると、以下のとおりであった。

- ・ ガイドラインの順守により、関連製品の品質アピールとなりうる。特に、塩基配列決定法との比較を含め、他の検出方法との比較により DNA チップの位置付けを明確にし、差別化をすることができる。
- ・ 遺伝検査技術の普及
- ・ デバイス共通に利用できる試薬開発を促す項目
- ・ 今後の製品開発、国際特許を含めた特許出願が行いやすくなる
- ・ 評価の基準、用語の定義
- ・ アレイを市販するに際して必要なチェック項目
- ・ 測定結果の生データ表示方法
- ・ プローブの名称
- ・ 発現解析における、バリエーションの取り扱い
- ・ ガイドラインに従って申請すると短期間で認可が取得できることを期待。国際標準では、プローブ配列の validation 項目
- ・ 診断・GMO 検査などにおいて、指標を設定することができる
- ・ 低精度・低品質商品の排除

4.1.9 国際標準化戦略と知財戦略の立案でお困りの点

2社からの回答があり、経験者の不足と遺伝子特許の扱いが上げられている。

4.1.10 標準化・ガイドライン化についてはどの部署が担当しているか

3社からの回答があったが、いずれもチップ開発の事業部で担当しており、特別の部署に移管されている感じではない。

4.1.11 業界で自主的に定める国際標準と当局規制に直結するガイドラインへの関与についての戦略面
未回答がほとんどであったが、製薬企業が薬剤の治験を海外で先行させた後、国内へ移行している現状をあげ、国内治験実施のハードルの高さについて指摘する意見があった。また、当局の規制に国際標準を取り入れさせることが必要だという回答があった。

4.1.12 標準化・ガイドライン化において現場との調整で工夫している点

検体およびデータの管理方法の工夫、データ回収および品質の維持とコスト面の調整という点があげられた。さらに国内規制以外に国際標準が存在する場合は、これを取り入れているという回答があった。

4.1.13 (キット中の) コントロール(陽性・陰性) 開発でお困りの点

特になしという意見が多かったが、ヒト由来コントロールへのアクセスの困難さや素性のはっきりしたコントロール入手の困難さの指摘、対象毎に異なるコントロールをなるべく統一したいという意見があった。

4.1.14 標準物質の利用方法について

標準物質の利用方法はあれば使う、あっても使わないの2択式で実施し、10社があれば使う、1社があっても使わないの結果であった。使わないという企業は、自らは製造側であるためという理由であった。

4.1.15 その他、ガイドライン・標準化について、コメント

ガイドラインや標準化によって、アレイ等の製造方法が限定されてしまうようであると困る。我が国のマイクロアレイ産業が発展しない理由の一つとしては、試薬業者が限られていることにある。特に GMP グレードで製造される試薬がなければ、応用されるアプリケーション開発がままならない。米国では LDT (セントラルラボアッセイ) としてマイクロアレイの臨床検査応用が進んできている。単一施設での利用も想定したガイドライン化が求められる。また、DNA チップの素材となる製品の供給メーカーや製造受託会社といった、部分的に携わる事業形態をとる場合特に、ガイドラインに対応することが事業継続において負担になる恐れがある、という意見もあった。

4.1.16 まとめ

昨年実施したヒアリング同様、ガイドラインへの期待が寄せられた。発現解析チップでは定量性が求められるため、開発が難しいと考えられており、各社興味をもっているものの開発中の企業は少ない。医療申請は前例もなく、認可へのタイムスパンが読めず対応が難しい。遺伝子検査の基準がなく、世界で活用されるための判断尺度がないことがハードルと感じられている。ガイドライン策定により、製造側の開発加速のみならず、審査側の審査期間短縮を期待している企業が多い。ガイドラインに従って申請することにより、許認可が加速されることが望まれているが、「あるべき姿」と実現可能性を勘案し、技術の進歩を妨げないような柔軟性のあるものを期待している。

各企業の一致した意見としては；

- ・ 普遍的、一般的な必要要件（評価項目や手順）を記載して欲しい
- ・ 細やかな規程、絶対値、具体的な数値基準は不要
- ・ 厳しすぎる規定は参入障壁になりかねず、また、緩すぎる数値は今後の技術開発の意欲を阻むものとなりかねず、数値限定は求められていない。

他に記載して欲しい項目；

- ・ 再現性（実検体で再現する系であるか否か）
- ・ 外部委託合成品（プローブ、標準物質等）の品質基準
- ・ 有効測定範囲
- ・ チップ品質の評価尺度
- ・ プロセス、レポートの記載項目

未承認の遺伝子検査を実費診療で行うケースが増加している。検査の質をどのように担保するかが今後の課題である。

4.2 海外企業ヒアリング調査結果

海外企業に対しては、調査レポート報告書 Global Biochip Markets: Microarrays and Lab-on-a-Chip（発行：BCC Research 出版：2011年8月）より対象企業をピックアップし、以下の4社に対し実際にヒアリング調査を実施した。開発状況、医療機器申請への対応、ガイドラインに関する評価について情報を収集し、主として国際標準化動向を調査した。

【ヒアリング実施先】

- ① ARRAYIT CORPORATION (Dr. Mark Schena, Ph.D., President)
- ② PATHWORK DIAGNOSTICS (Dave Craford, CCO)
- ③ PHALANX BIOTECH GROUP (Dr. Lester Lien, President US office)
- ④ BIOCARDIS (Dr. Nader Donzel, CTO)

4.2.1 ARRAYIT CORPORATION

【ヒアリング先】

Dr. Mark Schena, CEO（ヒアリング実施日：2012/2/9）

【企業概要】

1993年設立。マイクロアレイ作製、サービス、スポッティング装置、スキャナー、タンパクアレイ、DNA抽出キットの作製を行っている。OvaDx 子宮癌のスクリーニング検査を開発し、同キットのFDA PMA承認を目指している。

所在地：Sunnyvale, CA 94089

【ヒアリング内容】

- ・ Arrayit は現在、日本の大手企業とコラボレーションしている。
- ・ JMAC の示した DNA チップの位置付けは正確な分析である。(100gene レベルの遺伝子発現解析による診断用途には最適なツール)
- ・ 商用のマイクロアレイはシングルプレイヤーだけでなく、いろいろな企業による多種のプラットフォームが使われることに賛成である。
- ・ JMAC 等の標準物質を使うなど、第三者機関にクレジットされた製品ということで保証されるならばぜひ利用したい。特に日本企業との連携に有効であると考える。
- ・ JMAC に Arrayit も入会できるのかと質問を受けた。想定外の質問であったが、歓迎の意を伝えた。
- ・ RNA 標準物質が入手できるならばぜひ利用したい。
- ・ Arrayit の顧客は、Arrayit のチップと他社のチップ（アフィメトリクス、イルミナ、ニンブルジェン他）を組み合わせ使っていることが多いが、2つのプラットフォームを比べたくても比べられないケースが多い。
- ・ マイクロアレイに基づく検査では、患者および医師がその結果の意味を理解できないことが大きな問題である。
- ・ マイクロアレイによる診断ツール承認のシステムが完成すれば、マイクロアレイ市場の可能性は大きい。
- ・ 日米で合同のガイドライン作成するのであれば、協力することができる。
- ・ 対 FDA には承認する側の人々へ最新のマイクロアレイやバイオの技術を指導する活動も行っている。
- ・ 承認側への日常的な最新技術情報提供が重要である。

4.2.2 PHALANX BIO

【ヒアリング先】

Dr. Lester Lien, President US Office (ヒアリング実施日：2012/02/09)

【企業概要】

2004 年設立。安価な遺伝子発現解析用チップを開発している。全ゲノム解析可能なチップを 99 米国ドルで販売。(競合先は 160~250 ドル程度) 米国に加え、中国、台湾の市場を狙っている。

所在地：Belmont, CA 94002

【ヒアリング内容】

- ・ 現在の顧客はアカデミア（リサーチ）中心で、前臨床セッティングの中でのマーカー探索を行っている。将来は診断ツールにシフトしていくと思っている。
- ・ 遺伝子発現解析は薬剤投与の影響（メカニズム）を解明し、validation する重要なツールと捉えている。

- ・ 診断には、サイトジェネティクスと FISH 法があるが、FISH は時間がかかるなど、DNA チップの果たすべき役割があると考ええる。
- ・ 肝臓癌の再発についての研究を行っている。遺伝子発現解析でメカニズムをみようというもの。実用化はアジアを視点においている。本社、アレイ工場は台湾にあるため。米国はマーケティング拠点。
- ・ 現在の潮流としては、各社は自分で見つけたバイオマーカーのために自ら CLIA ラボを立ち上げるのが主流になりつつある。最も手早く less stringent に規制をクリアする方法となっている。
- ・ 象徴的なのは、Genomic Health 社の OncoType。既に大量の患者データがあることで、規制に新しい Path をもたらそうとしている。
- ・ 一方で FDA は、CLIA で行われる LDT の規制を監視しようとしており、どんどん厳しくなっている。会社の戦略として、相対的に規制の甘い欧州の CE マーク（6年の期限付き）を得ようとしているところもある。
- ・ 現在は製薬企業が診断企業を抱きかかえるケースも増えており、最新のトピックとしてはロシュのイルミナ買収である。
- ・ マイクロアレイはローコストの診断分野で可能性がある。
- ・ マイクロアレイは qPCR と次世代シーケンサーの狭間の存在だが、qPCR はダイナミックレンジは広いが、信頼性の面でクエンスチョンであるし、次世代シーケンサーは膨大なデータ解析が診断の現場にはまだ遠く、マーカー探索用途であろう。
- ・ その間の存在が、マイクロアレイだが、技術は既に成熟している。問題はコンテンツで、誰がスイートスポットを当てられるかに掛かっている。
- ・ 企業の動向としては、イルミナ社はビーズマイクロアレイよりも NGS にシフト、アフィメトリクスは診断用チップ、但し、コンテンツ開発はパートナー企業が担当する方式、アジレントは診断ツール開発には関心が薄いと見ている。
- ・ 今後も台湾の本社・工場と日本の JMAC はじめチップ企業とコラボレーションできる。我々はオープンである。

4.2.3 PATHWORK DIAGNOSIS

【ヒアリング先】

Dr. David Craford, Chief Commercial Officer（ヒアリング実施日：2012/02/10）

【企業概要】

2008 年 Tissue of Origin が FDA の IVDMA 承認（多変量指数測定承認）を受けた。
アフィメトリクス基板を採用。15 種の癌腫について原発組織を検出可能。
2010 年ホルマリン包埋サンプルの利用も FDA 承認を受けた。2010 年ノバルティス社と癌バイオマーカー探索で提携を発表。

所在地：Redwood City, CA 94063

【ヒアリング内容】

- ・ 現在の状況で一番問題なのは、患者の負担額（健康保険）である。遺伝子発現の診断は技術的に4000～5000ドル掛かるものだが、個人としてはとても払えるものでなく、数百ドルでも患者負担は無理と言われる現状に困っている。
- ・ アメリカでは、CLIA、CAP、MMWR、FDA など規制の重複があり、一本化されていない問題がある。この中で、ニューヨーク州の条例が最もうまくいっているようだ。州境を超えると通用しない。ニューヨーク州では、州内での体外診断薬の実施において、州独自の承認を得なければならない。
- ・ JMAC の検量線を引くことができる標準物質の開発はよい出発点だ。qPCR, NGS にも使えるとよい。
- ・ ヒトの FFPE サンプルに用いる標準物質があるととても役に立つ。入手できるのかと質問があり、JMAC で開発中であり、完成は2014年を目指している旨、回答した。アメリカでも買えるようになるかとの質問に、その予定であると回答した。
- ・ ライフテクノロジーズ社の出した KRAS のコントロール、UK の会社の出した EGFR のコントロールはまだ試していないが、関心があるとのことであった。
- ・ Pathwork 社としては、FDA 承認を2つ通した。1つは Tissue of Origin 凍結サンプル用、もう1つは Tissue of Origin FFPE サンプル用である。その後、PMA として通った。FDA IVDMA を通すのに Tissue of Origin 凍結サンプル用には2.5年、Tissue of Origin FFPE サンプル用は9ヵ月掛かった。
- ・ FDA とは承認を受けるにあたり、IDE (Investigation Device Exemption, 治験用医療機器に対する適用免除) ミーティングを重ねた。
- ・ ガイドラインとレギュレーションは違うもの。体外診断薬は FDA 承認を通すべき。Genomic Health 社（隣のビル）の OncoType は CLIA のもとに FDA を回避しているが、キットを出す企業は FDA 承認を取るべきだと私は考える。

4.2.4 BIOCARTIS SA

【ヒアリング先】

Mr. Nader Donzel, Chief Technical Officer

Dr. Nicolas Demierre, Head of Engineering

(ヒアリング実施日：2012/02/13)

【企業概要】

Biocartis 社は、スイス連邦工科大学ローザンヌ校の中のインキュベーションセンターに入っている。マイクロフルイディクス技術による診断、創薬市場を狙っている。2010年、Royal Philips Electronics 社の診断プラットフォームを買収した。本プラットフォームを用いた診断デバイスを2012年に発表したいとしている。一つの検査開発に絞り、対象は中小規模のラボとしている。

プラットフォームは、PCR、高温槽、DNA、RNA、メチレーション DNA 実験に利用できるものを想定している。検査サイトから検査室、病院、医療機関までの双方向データ通信のデバイスも用意する。

Biocartis 社は、Philips 社と提携してプラットフォーム開発および検証を行っている。2010 年 11 月には bioMerieux 社とも提携を発表し、Biocartis 社プラットフォームを利用した診断法を共同開発することになった。

【ヒアリング内容】

- ・ バイオカーティス社の製品は、2012 年中に研究用途、2013 年中には診断用途向けに市場へ参入するべく、開発の最終段階に入っている。開発中の製品はマイクロフルイディクス技術による診断ツールであり、商品名は社名の BIOCARDIS とする予定とのことである。先行する製品は ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) であるが、ELISA のランニングタイム 2～3 時間に対し、BIOCARDIS は 5～10 分という市場競争力を持つ。さらに、ランニングに要する作業も ELISA のピペッティング 10～15 回以上に対し、BIOCARDIS は 2 回のみと自動化が進んでおり、再現性の高い結果が得られる仕組みとなっている。本製品は、たんぱく質の定量だけでなく、DNA、RNA などの核酸の定量にも利用できる。
- ・ 開発は、フィリップ社、ビオメリュー社と提携して行われており、診断用として市場投入するにあたり、既に FDA との PMA 市販前承認の相談フェーズに入っており、事前相談ミーティングを重ねているとのことである。IVDMIA のような多変量解析ではなく、既存の項目の新規参入であることから、FDA との交渉はスムーズであると想定される。
- ・ 製品の再現性は、プラットフォーム上（シリコン基板）に並んだ圧倒的な数のマイクロパーティクル（直径 50 μm）で計測することにより担保している。ネガティブコントロール、ポジティブコントロールも利用する。
- ・ 一般に診断技術においては、新技術の新規性よりも診断結果の正確性が問われており、技術開発のみで解決しない。例えば、IHC（免疫組織化学、いわゆる免疫染色法）による診断は、人が介在し、ブレの大きいとされる技術でありながら、病理医・医師による判断で診断されることにより信頼を得ている。BIOCARDIS 社としては、新技術の導入により、ヘルスケアに掛かるコストの低減を図り、POCT (Point of care testing) の市場で 1 時間以下の診断を実現し、参入したい、と考えている。

4.2.5 その他の海外企業動向（参考資料）

【オランダ・ベルギー】

AGENDIA BV Science Park 406 1098 XH Amsterdam The Netherlands Tel: 31-20-462-1500; Fax: 31-6-123-50044 Website: www.agendia.com	マイクロアレイによる遺伝子発現解析体外診断薬のパイオニア。商品名：マンマプリント、ブループリント、ターゲットプリント、カッププリント ほか。2007 年乳癌用のマンマプリントが FDA の IVDMIA 承認。自国のアムステルダムに加え、米国カリフォルニアに CLIA 承認ラボを構え、米国市場を拡大中。Genomic Health 社の OncoType DX と激しく競合している。
KONINKLIJKE PHILIPS ELECTRONICS N.V. Amstelplein 2 1096 BC Amsterdam The Netherlands	フィリップ社は自社のバイオセンサー、マイクロアレイ基板ビジネスを企業提携によりアグレッシブに展開している。2008 年 Epigenomics AG 社と提携し、DNA メチレーションの全自動体外診断装置を共同開発中。2009 年 Moxtek 社とは基板開発で提携し、ライセンスアウトを

Tel: 20-597-7777; Fax: 31-20-591-7210 Website: www.philips.com	目指している。 2010 年、bioMerieux 社と提携、ベッドサイドで利用できるバイオチップ開発に着手した。磁気ナノ粒子を用いる Magnotech 基板を展開予定。免疫測定を狙っている。
LIONIX BV Hallenweg 6 7522 NH Enschede The Netherlands Tel: 31-53-489-3827; Fax: 31-53-201-1303 Website: www.lionixbv.nl	トゥウェンテ大学のスピナウト ラブオンチップ技術、集積光学技術開発。 コア技術は microfluidics, optofluidics, and integrated optics.

MDXHEALTH S. A. Tour 5 GIGA niveau +3 Av. de l'Hopital 11 4000 Liege Belgium Tel: 32-4-364-2070; Fax: 32-4-364-2071 Website: www.oncomethylome.com	ベルギー OncoMethylome Sciences SA から名称変更 エピジェネティクス技術を用いて診断 2010 年、バイオマーカーを外部依存から自力販売へ路線変更 米国内の CLIA 承認ラボ (LabCorp) でサービス展開 薬剤シレンジチド、メルク・セローノ社と共同で臨床試験フェーズ III 実施中 (脳腫瘍、抗癌剤) プロモーター領域 DNA メチレーション技術 ロシュ社ほか大手各社とも提携 業績: 2010 年脳腫瘍分野で 1500 万米国ドル歳入
PAMGENE INTERNATIONAL B. V. Nieuwstraat 30 5211 NL's-Hertogenbosch The Netherlands Tel: 31-73-615-8080; Fax: 31-73-615-8081 Website: www.pamgene.com	2000 年設立 PamGene ペプチドアレイは、ペプチド (各ペプチドは 15 個のアミノ酸配列) 144 種で構成されるアレイ
PEPSCAN PRESTO BV Zuidersluisweg 2 B243 RC Lelystad The Netherlands Tel: 31-320-225300; Fax: 31-320-225301 Website: www.pepscan.com	商品名 PepChip ペプチドアレイを得意とし、カスタムチップ作製、エピトープマッピングサービスを展開している。

QIAGEN Sporstraat 50 Venlo 511 KJ The Netherlands Tel: 31-77-320-8400; Fax: 31-77-320-8409 Website: www.qiagen.com	DNA/RNA 関連試薬技術トップクラス 2007 年 Digene 社を買収 ベクトン・ディッキンソン社とプリアナリティクス社を設立 2009 年 DxS 社を買収 RT-PCR 検査 7 サービス DxS 社買収によりコンパニオン診断薬に本格参入 TheraScreen KRAS mutation kit EGFR 阻害薬に対する KRAS 変異検査 CE Mark 取得済み、FDA 承認目指す。 DxS 社はキアゲン社製 QIAAsymphony 及び Rotor-Gene プラットフォーム使用
--	--

SKYLINE DIAGNOSTICS B. V. Dr. Molewaterplein 50 Ste. Ee1971 3015 GE Rotterdam The Netherlands Tel: 31-10-703-8410; Fax: 31-10-704-3076 Website: www.skyline-diagnostics.nl	エラスムス大学からのスピントアウト 商品名: AMLProfiler 遺伝子発現解析により AML（急性骨髄性白血病）の分類が可能 2009 年 CE mark 2011 年 FDA 準備中 Affymetrix 基板
--	--

【ドイツ】

ALERE TECHNOLOGIES GMBH Loebstedter Str. 103-105 D-07749 Jena Germany Tel: 49-3641-3111-0; Fax: 49-3641-3111-120 Website: www.alere-technologies.com	ラブオンチップ技術 Epocal はラブオンチップ利用のワイヤレス血液ガス、電解質アナライザー。 Pima CD4 test は 2009 年 CE Mark 取得。ラブオンチップ上で、血液を溶解し、HIV 核酸を捕捉・増幅する。欧州、アジア、南米、アフリカ市場に進出。 BNP タンパク測定（心不全用）は、マイクロフルイディクス、タンパクアレイ技術。血漿から BNP をフィルターし、キャピラリーでチャンバーに移動させ、蛍光標識したタンパク試薬を反応させる。ハンドヘルド式の装置でシグナル強度を測定、ベッドサイド利用可能。
ARRAY-ON GMBH Am Schwabeplan 1b D-06466 Gatersleben Germany Tel: 49-38482-79-9911; Fax: 49-39482-7999-23 Website: www.array-on.com	2003 年設立 SNPs アレイに強み。
BIOSCORA Deutscher Platz 5c, D-04103 Leipzig Germany Tel: 49-341-2222-0310; Fax: 49-341-2222-9320 Website: www.bioscora.de	タンパクアレイ 抗体アレイ ラブオンチップ技術 標識不要のタンパク検出システムを開発した実績あり。

BOEHRINGER INGELHEIM MICROPARTS GMBH Hauert 7 D-44227 Dortmund Germany Tel: 49-231-9799-0; Fax: 49-231-9799-100 Website: www.microparts.de	2004 年 Steag microParts GmbH を合併、MEMS のインクジェットプリント技術。 商品名 : Lilliput Chip 同社はラブオンチップ技術の一部として採用されるポリマーベースのマイクロモジュール（マイクロ分光）に強みを持つ。
FEBIT BIOTECH GMBH Im Neuenheimer Feld 519 D-69120 Heidelberg Germany Tel: 49 6221-6510-300; Fax: 49 6221 6510-329 Website: www.febit.com	Geniom DNA sequence information 一日でデータ解析可能なシステム miRNA
INOSTICS GMBH Falkenried 88 20251 Hamburg Germany Tel: 49-40-413-373-90; Fax: 49-40-413-383-99 Website: www.inostics.com	創薬のためのツール BEAMing technology 磁気ビーズ上での一分子 PCR
JPT PEPTIDE TECHNOLOGIES GMBH Volmerstrasse 5 (UTZ) 12489 Berlin Germany Tel: 49-30-6392-5500; Fax: 49-30-6392-5501 Website: www.jpt.com	高密度ペプチドアレイ

PEPPERPRINT GMBH Rischerstrasse 12 D-69123 Heidelberg Germany Tel: 49-6221-72644-88; Fax: 49-6221-72644-75 Website: www.pepperprint.com	高密度ペプチドアレイ バイオマーカー探索サービス事業を展開 ドイツ癌研究所からのスピナウト アミノ酸粒子と 20 色のレーザープリンターを用いて作製されるチップ
PROTAGEN AG BIOTECHNOLOGIE Otto-Hahn Strasse 15 Dortmund 44227 Germany Tel: 49-231-9742-6300; Fax: 49-231-9742-6301 Website: www.protagen.de	UNIchip タンパクアレイマックスプランク研究所で開発された UNICloner がキーテクノロジー 診断薬メーカーと提携し、増資して事業強化中。前立腺癌、多発性硬化症などに強みを持つ。
SIEMENS AG	VERSANT® HCV RNA 3.0 Assay (bDNA) バイエル社の診断

Healthcare Sector Henkestrasse 127 D-91052 Erlangen Germany Tel: 49-69-797-6602; Fax: 49-911-895-15-7999 Website: www.medical.siemens.com	部門を吸収合併、デイド・ペーリング社を買収し、診断部門を強化している。 2008年にC型肝炎モニタリング検査でFDA承認
---	---

SIGNATURE DIAGNOSTICS AG Hermannswerder 20 A 14473 Potsdam Germany Tel: 49-331-2000-200; Fax: 49-331-2000-209 Website: www.signature-diagnostics.de	アフィメトリクス基板 大腸癌 商品名: Detector C、Predictor C、早期発見、予後予測、
SIRS-LABS GMBH Otto-Schott-Strasse 15 07745 Jena Germany Tel: 49-3641-3103-100; Fax: 49-3641-3103-102 Website: www.sirslab.de	DNA 前処理装置 PCR/microarray ベースの敗血症検査 イエーナ大学スピンアウト ファイザーと共同研究 医療経済的な有利さを追求

【スイス】

AYANDA BIOSYSTEMS SA PSE Parc Scientifique Building C, EPFL CH-1015 Lausanne Switzerland Tel: 41-21-693-8631; Fax: 41-21-693-8631 Website: www.ayanda-biosys.com	Ayanda Biosystems社 2001年設立 スイス連邦工科大学ローザンヌ校からスピンアウト。 数種の創薬用・分子診断アプリケーションのバイオチッププラットフォームを開発。微小電極アレイバイオチップ、NucliPrep lab-on-a-chip（核酸サンプル）が主要製品である。 癌バイオマーカーのBARD1たんぱくを検証済み。BARD1たんぱくは乳癌・子宮癌の治療法選択のマーカーの可能性。血液ベースのサンプルで臨床研究を実施している。 EUよりプロジェクト資金を得ている。
---	---

BIOCARTIS SA Scientific Parc EPFL, PSE-C CH-1015 Lausanne Switzerland Tel: 41-21-693-9051; Fax: 41-21-560-4291 Website: www.biocartis.com	Biocartis社は、スイス連邦工科大学ローザンヌ校の中のインキュベーションセンターに入っている。マイクロフルイデックス技術による診断、創薬市場を狙っている。2010年、Royal Philips Electronics社の診断プラットフォームを買収した。本プラットフォームを用いた診断デバイスを2012年に発表したいとしている。一つの検査開発に絞り、対象は中小規模のラボとしている。 プラットフォームは、PCR、高温槽、DNA、RNA、メチレーションDNA実験に利用できるものを想定している。検査サイトから検査室、病院、医療機関までの双方向データ通信のデバイスも用意する。 Biocartis社は、Philips社と提携してプラットフォーム開発および検証を行っている。2010年11月にはbioMerieux社とも
---	---

	提携を発表し、Biocartis社プラットフォームを利用した診断法を共同開発することになった。
DIAGNOSWISS S. A. ZI Les llettes, Secteur 4 CH - 1870 MONTHEY Switzerland Tel: 41-24-473-7540; Fax: 41-24-473-7541 Website: www.diagnoswiss.com	diagnoSwiss社 1999設立。 スイス連邦工科大学ローザンヌ校からスピアウト。 高分子ベースのラブオンチップ（プロテオミクス、創薬、診断用） 主要製品は、たんばくの抽出、分離、解析をELISA法（サンドイッチ法、競合法）で行うラブオンチップ。
GENEWAVE S. A. S. XTEC, Bat. 404 Ecole Polytechnique Campus 91128 Palaiseau France Tel: 33-1-6933-1575; Fax: 33-1-6933-1576 Website: www.genewave.com	Genewave社はマイクロアレイ製品および分子診断アプリケーションの開発、販売を行っている。 開発中の分子診断法に院内感染症、インフルエンザの早期検出がある。 インフルエンザ検査フォーマットはマイクロフルイディクス技術でRNAを抽出し、その後、RT-PCR microarray解析を行う。

ROCHE HOLDING AG Konzern-Hauptsitz, Grenzacherstrasse 124 Basel Switzerland Tel: 41-61-688-1111; Fax: 41-61-691-9391 Website: www.roche.com	製薬最大手。2009年歳入93億ドル。 高密度マイクロアレイのNimbleGen社を買収し、次世代シーケンサーの454 Life Sciences社を買収した。 ロシュ社の製薬部門にはロシュ・ファーマ、Genentech社、中外製薬が含まれている。診断部門は、全歳入の20%を占めている。ロシュ社は既に、AmpliChip（マイクロアレイ）、TaqMan（real-time PCR）、Ventana Medical Systems（免疫染色法、in situ ハイブリダイゼーション）、Elecsys（電気化学発光免疫測定法）で体外診断薬に市場参入している。DNAシーケンシングによる体外診断でも優位性を持っている。 ロシュ社はマイクロアレイのFDA承認を目指している。 NimbleGen社チップは癌の分野に注力している。 2010年中国のバイオチップ開発企業CapitalBio社と提携。 NimbleGenチップの処理工程の効率化を図っている。巨大な中国市場を視野に入れている。中国の体外診断市場に既に参入実績がある。 2010年ロシュ社はナノポア技術とシリコンチップによるDNAシーケンシングの共同開発のため、IBM社との提携を発表。IBMでは米国国立衛生研究所（NIH）の助成金を受け、技術開発を行っており、ロシュ社の研究費が追加された格好。ロシュ社では、454 Life Sciences社を通じて、ナノポアシーケンサーの市場独占を狙っている。 2010年Roche Applied Sciences社はExiqon社と提携し、RocheのリアルタイムアッセイとExiqonのmiRCURY LNA Universal RT microRNA qPCR systemを販売することにした。Exiqonの技術は、FFPE、血漿、血清などから抽出した微量のmicroRNAの定量に優れており、RocheのmiRNA診断ビジネスを強化するものである。
---	---

SCANDINAVIAN MICRO BIODEVICES APS	Scandinavian Micro Biodevices (SMB) 社 2000年設立。獣医の現場で、簡便に診断できるPOC市場を狙
--	---

Gammelgaardsvej 87C DK-3520 Farum Denmark Tel: 45-7020-7303; Fax: 45-7020-7304 Website: www.smb.dk	っている。測定はマイクロフルイディクス技術のラブオンチップ法である。 2003年、現Alere社に買収され、2006年、拠点がスコットランドに移った。その時にヒト以外の診断市場の部門が独立し、現在はデンマークにSMB社として存在している。
--	--

5. 次世代シーケンサー開発動向に関する調査

5.1 次世代シーケンサーの分類

次世代シーケンサーとは、Sanger シーケンシング法を利用した蛍光キャピラリーシーケンサーである「第1世代シーケンサー」と対比させて使われている用語である。米国を中心に50機関（チーム）以上のベンチャー企業や研究組織がしのぎを削って、次世代シーケンシング技術の開発を行い、多様な機器や技術が誕生した。これらの機器や技術の特徴を比較するために、次世代シーケンサー、次々世代シーケンサーなど、分類しようという試みがなされている。これまで発表された次世代シーケンサーやシーケンシング技術の特徴は、第2世代、第3世代、第4世代と分類できる。米国では、2003年以降 National Human Genome Research Institute が\$1,000 ゲノム・グラントを提供しているように、次世代シーケンス技術の開発の主目的は、塩基配列決定のコストダウンであった。第2世代シーケンサーでは、光検出を行うために特殊な試薬や検出器を必要とし、また第3世代や第4世代と比べて単位時間当たりの配列決定量も大きくないので、コストが高くなる。一方、第3世代シーケンサーは、1分子のDNAを鋳型としてDNAポリメラーゼの合成速度で塩基配列を読むために、単位時間当たりの配列決定量も大きく、コストダウンにつながることが期待されている。第4世代シーケンサーは、光検出を行わないので、試薬代が安価になり、かつ光検出器が必要なくなり、機器も安価になることが期待されている。またDNAサンプル調製もより簡便になると思われる。

（表 5.1.1）次世代シーケンサーの分類

項目・分類	第2世代シーケンサー	第3世代シーケンサー	第4世代シーケンサー
原理・特徴	逐次DNA合成・光検出法を用いた超並列シーケンシング DNAポリメラーゼまたはDNAリガーゼによる逐次的DNA合成法を用いて、蛍光・発光など光検出により、超並列的に塩基配列を決定する	1分子リアルタイム・シーケンシング DNA1分子を鋳型としてDNAポリメラーゼによりDNA合成を行い、1塩基ごとの反応を蛍光・発光などの光で検出することにより、リアルタイムで塩基配列を決定する	Post-light シーケンシング 蛍光・発光など光検出以外の検出方法により、超並列的に塩基配列を決定する
配列決定スループット	1～25 Gb/day	未発表	>100 Mb/run (hr) (Ion Torrent Systems)
機器の価格	2000万円～1億円	695,000ドル (Pac. Bio.)	45,000ドル (Ion Torrent Systems)
配列決定精度	一般的にエラーが多い	エラーが多い (Pac. Bio.)	優れている (Ion Torrent)
1リード長	25～400塩基程度	1000塩基、最大10 kb (Pac. Bio.)	100～200塩基 (Ion Torrent)

開発企業・ 開発組織	(DNA ポリメラーゼによる合成) ・ 454 ・ Illumina ・ Helicos ・ Intelligent Bio-Systems ・ LaserGen ・ Lightspeed Genomics (DNA リガーゼによる合成) ・ SOLiD ・ Complete Genomics ・ Danaher Motion Polonator ・ GnuBio	(1 分子リアルタイム DNA 合成) ・ Pacific Biosciences ・ Life Technologies (VisiGen) ・ Cracker ・ Columbia Univ. ・ Harvard Univ. ・ Mobious Biosystems ・ GE Healthcare ・ Univ. of California, San Diego	(タンパク・ナノポア) ・ Oxford Nanopore ・ Univ. of Washington ・ Electronic Bio Sciences (ソリッドステート・ナノポア) ・ NABsys ・ IBM ・ NobleGen Biosciences ・ Stratos Genomics ・ その他多数の大学 (タンパク/ソリッドステート・ハイブリッドナノポア) ・ Kavli Institute of Nanoscience (水素イオン検出) ・ Ion Torrent Systems (温度上昇検出) ・ GenapSys (DNA 電荷測定) ・ Caerus Molecular Diagnostics (電子顕微鏡) ・ Halcyon Molecular ・ ZS genetics (Tunneling signal) ・ Arizona State Univ. ・ Imperial College London ・ 大阪大学 (ナノサイズの櫛) ・ Reveo (Carbon nanotube) ・ Arizona State Univ. (Graphene) ・ California State Univ. ・ Univ. of Pennsylvania ・ Kavli Institute of Nanoscience
---------------	---	--	---

出典：株式会社ジナリスのウェブサイト

http://genaport.genaris.com/GOC_sequencer_post.php?eid=00001

(表 5.1.2) 次世代シーケンサー製品一覧

企業	技術・製品	仕様 その他
イルミナ社	Gene Analyzer IIx	迅速なワークフローを採用し、2x 150bp のリード長と 5 億を超えるリード数
	HiSeq1000、2000 シーケンシステム	1 ランあたり 540-600 G b ヒトゲノム 30x カバレッジの高精度データを低コストで産出

	MiSeq	卓上型 リード長 2x 150bp、ラン時間 27 時間、データ量 1.5-2.0Gb
アプライドバイオシステムズ社・ライフテクノロジー社	SOLiD システム フローセルを利用した パラレルシーケンス プラットフォーム	SOLiD5500xl 1 日当たり 20-30Gb の DNA シーケンス可能。1 回のランで、ヒトゲノム 2 人分、全エクソーム 24 人分、あるいは全トランスクリプトーム 12 人分を高い精度で解析することが可能。リード長 75 bp, ナノビーズ技術 1 日 30-45Gb、1 ランで 3 人以上のゲノムを解析することができる。
ロシュ 454 ライフサイエンス社	Genome Sequencer FLX	リード長最長 1,000 塩基 リード数 約 1,000,000 リード ラン時間 23 時間
イオントレント社・ライフテクノロジーズ社	Ion PGM	水素イオン半導体チップ上の高密度アレイを用いた技術 高速シーケンス：3時間以内 ハイスループット：最大約1Gbのデータ量、500万-700万リード産出 ロングリード：200bpまで
コンプリートジェノミクス社	Complete Genomics	開発したシーケンサーの販売はせず、受託サービスのみ DNA nanoball アレイと合成 DNA を用いるライゲーション法

パシフィックバイオ社	PacBio RS	1 分子リアルタイムシーケンシング (SMRT) 技術 DNA 合成をリアルタイムでモニタリング 最長で 25kb、平均でも 2000b の解析が可能であるとされる
Dover Systems	Polonator G.007 第二世代シーケンサー	ハーバード大学医学部との共同開発。解析ソフトはオープンソース、試薬は市販されているものを組み合わせて使う。導入費用とランニングコスト低減を目指して開発されたもので、本体価格は 17 万ドル。ユーザーコミュニティによる改良を前提としているため、研究者が自分で工夫しなければならないことも多い。
Halcyon Molecular 社	透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いた技術	1000 ドルゲノムプロジェクトから 250 万ドルの資金助成を得て開発された。
ヘリコスバイオサイエンス社	Helicos Genetic Analysis System Helicos Single Molecule Sequencer	1 分子でシーケンスを行う 塩基読み取りは、化学的に塩基と切断可能な箇所に蛍光を付けてその蛍光を読み取る。 Virtual Terminator と呼ばれる通り、蛍光読み取りごとに反応を止める。 リード長 32 塩基

Intelligent Bio-Systems	Max-Seq Genome Sequencer	4 種類の Nucleotide reversible terminators を用いた Intelligent Bio-Systems Sequencing-By-Synthesis Intelligent Bio-Systems (SBS) 法 コロンビア大学のチャーチ教授のリバーシブルターミネータを使用。 2 フローセル*8 レーン=16 個サンプル 1 ランあたりの出力塩基配列量は最大約 100 Gb リード長は 35 bp/55 bp
-------------------------	--------------------------	--

(表 5.1.3) 卓上型次世代シーケンサーの比較

	Roche454 ジュニア	MiSeq	PacBio RS	ion torrent
データサイズ	40Mb	1Gb	1.6Gb	0.175Gb
リード長	400bp	150bp*2	>1000 bp	1000bp
ラン時間	10 時間	27 時間	2 時間	2 時間
前処理時間	48 時間	12 時間	12 時間	6 時間
ランニングコスト	15 万円	16 万円	—	

5.2 次世代シーケンサー技術

5.2.1 MPSS 法 (Massively Parallel Signature Sequencing)

次世代シーケンサー技術の先駆的存在 (1990 年代)。MPSS 法は Lynx Therapeutics 社による技術であり、アダプターライゲーション、アダプターデコーディング、シーケンスの順で行う。特定のシーケンスのバイアス、ロスなどの影響を受けやすい。受託専用機にして、装置販売に至らなかった。ソレクサ社による合併で 1 塩基合成反応 (SBS 法) の開発が進んだ。MPSS は時代遅れとなったが次世代シーケンサーの基盤を築いた。MPSS は遺伝子発現レベルの測定用に cDNA シーケンスに用いられた。2004 年にソレクサ社と合併したが、さらにイルミナ社に買収されることとなる。

5.2.2 Polony 法

ポロニーシーケンスは、フルゲノムシーケンスに用いるシステムとして 2005 年、ハーバード大学で開発された。インビトロ aired-tag ライブラリーをエマルジョン PCR、自動化マイクロスコープ、ライゲーションベースのシーケンシングと組み合わせ、大腸菌のゲノムシーケンスを 99.9999%以上の正確さで読んだ。サンガー法によるシーケンシングの 10 分の 1 のコストとなった。Agencourt Biosciences 社、Agencourt Personal Genomics 社と変遷し、最終的には Applied Biosystems 社の SOLiD プラットフォームへ組み込まれた。

5.2.3 454 パイロシーケンシング法

454 Life Sciences 社によりパイロシーケンシングが開発されていたが、Roche Diagnostics 社に買収された。エマルジョン PCR で DNA を増幅させる方法を用いる。

DNA 断片 1 分子とビーズ 1 粒子が分配されたエマルジョン液胞中で、1 種類の DNA 断片が増幅されビーズ表面に結合する。このビーズを特殊な反応器の各ウェルに 1 粒子ずつ数十万個を充填する。パイロシーケンシングはルシフェラーゼを用いて、DNA に付加された各核酸の光で検出する。統合されたデータがシーケンスリードアウトとして生成される。この技術はサンガー法に比較して、1 ベースあたりのリード長と価格について半分程度を実現した。対ソレクサ、対 SOLiD についても同様。

5.2.4 イルミナ（ソレクサ）法

Solexa は現在イルミナ社に買収された。可逆的ターミネーター法に基づく技術である。DNA 分子はまずスライド上のプライマーに付加され、ブリッジ法によって増幅される。4 タイプの可逆的ターミネーター（RT-bases）が付加され、取り込みが起らなかったヌクレオチドは洗浄される。パイロシーケンシングと違い、DNA は一度に 1 個のヌクレオチドを伸長する。蛍光標識したヌクレオチドをカメラで撮影する。3' 末端のブロッカーの標識は DNA から化学的に除去され、次のサイクルに入る。

5.2.5 SOLiD 法

アプライドバイオシステム社 SOLiD 技術は、ライゲーションによるシーケンスを採用している。固定された長さのオリゴヌクレオチドはシーケンスされる位置によって標識される。オリゴヌクレオチドはアニール後にライゲーションされる。DNA リガーゼによる優先的ライゲーションは、配列の決まったヌクレオチドと結合させることにより配列情報を得る。シーケンス前に DNA をエマルジョン PCR によって増幅する。ビーズは同一 DNA 分子のコピーしか含んでおらず、これをスライド上に沈着する。イルミナ社のシーケンサーと比較可能な定量性と長さをもったシーケンスが可能である。

5.2.6 イオン半導体法

Ion Torrent Systems Inc. は、標準的なシーケンス化学に基づくシステムを採用している。但し、半導体による検出システムという新しい技術である。この方法は、DNA ポリメライゼーション時に放出される水素イオンを検出する技術であり、他のシーケンサーで採用されている光学による方法と異なっている。DNA 鎖テンプレートを含むマイクロウェルは、1 つのヌクレオチドで充満して配列を読む。充満したヌクレオチドがテンプレートのヌクレオチドと相補的であれば、相補鎖に取り込まれていく。この時、水素イオンが放出され、超高感度センサーに反応する。テンプレート中にホモポリマーの繰り返しが存在すれば、複数のヌクレオチドが 1 サイクル中に取り込まれる。これに対応する水素イオンが放出され、電気信号が計算される。

5.2.7 DNA ナノボール法

DNA ナノボールシーケンスは、個体の全ゲノム配列を決定するのに利用されたハイスループットタイプのシーケンス技術である。コンプリートジェノミクス社では研究者のサンプルをこの技術でシーケンスした。DNA 断片を DNA ナノボールへと増幅する回転方式の増幅法を利用する。ライゲ

ーションによる非連鎖シーケンスでシーケンスを決定する。一回のランでたくさんの DNA ナノボールのシーケンスが可能であり、他のシーケンシングプラットフォームに比較して、安価な試薬代で済む。しかし、短い DNA の配列しかできないことから、ゲノムマッピングが困難である。この技術はゲノムシーケンスのいくつかのプロジェクトで採用されており、普及の可能性がある。

5.2.8 Heliscope 1 分子シーケンス法

ヘリスコープは、1 分子シーケンス技術に基づいており、フローセル表面に取り付けられた polyA アダプターの付いた DNA 断片を利用する。extension ベースのシーケンス法で、蛍光標識されたヌクレオチドのフローセルの洗浄を数回繰り返す。（1 回に 1 ヌクレオチドのサンガー法に同じ）リードは、ヘリスコープシーケンサーで行う。リード数は短い（1 回のランで 55 塩基）、正確なホモポリマーや RNA シーケンスが可能とされる。

5.2.9 SMRT 一分子シーケンス法

一分子シーケンス（SMRT）は、合成法によるシーケンシングである。DNA はいわゆるゼロモードウェーブガイド（ZMWs）によって合成される。小さなウェルの底にキャプチャリングツールが入っている。シーケンシングは、増幅のないポリメラーゼ（ZMW の底に付けられている）と溶液中を自由に浮遊している蛍光標識されたヌクレオチドで行う。ウェルの底で生じる蛍光のみを読み取る。蛍光標識は、DNA 鎖に取り込まれるときにヌクレオチドから分離され、修飾のない DNA 鎖を得ることができる。一分子シーケンス（SMRT）を開発しているパシフィックバイオサイエンス社によると、この方法では、シトシンのメチル化など核酸の修飾を検出することができるとしている。ポリメラーゼのキネティクスを利用する。

5.2.10 1 分子リアルタイムシーケンシング法（RNAP 法）

この技術は、RNA ポリメラーゼ（RNAP）に基づくものであり、ポリスチレンビーズに付けられた RNA ポリメラーゼと、別のビーズに付けられた DNA 末端と一緒に光トラップ（光ピンセット）の中に置く。転写中の RNAP の動きはビーズを近づけるので、双方の距離が相対的に変化する。1 ヌクレオチドが分解するときの記録を取る。配列は、4 ヌクレオチド毎に変化する濃度の変化を読み取って決定する。（サンガー法に似ている。）

5.2.11 ナノポアシーケンシング法

この方法は、シクロデキストリンと重結合したアルファヘモリジンのポア（穴）を通過するヌクレオチドが発する電気信号をリードアウトする技術である。DNA がナノポアを通過する時、イオン電流が変化する。この変化は DNA 配列の形状、サイズ、長さにより違っている。どのタイプのヌクレオチドもある一定の時間、ポア内のイオンの流れを妨げる。この技術は、核酸の増幅を必要としないので、製品化が期待されているが、現時点では、まだ入手できない。

5.2.12 VisiGen Biotechnologies 社技術

VisiGen Biotechnologies 社が採用した技術は、特別に製作した DNA ポリメラーゼを利用している。このポリメラーゼがセンサーとして働く。センサーはドナー蛍光の活性部に取り込まれている。ド

ナー蛍光が FRET（蛍光共鳴エネルギー移動）によって反応する。この方法は、ポリメラーゼが配列中にヌクレオチドが取り込むスピード（1秒間に数百）でのリードアウトを実現した。DNA 鎖へ取り込まれた後、ヌクレオチドの蛍光色素が放出される。この方法で 1000 塩基を読めるとしているが、検証を待たなければならない。

6. DNA チップによる遺伝子診断の基盤研究

本課題については、特に DNA チップを使用しているというものではないが、今後市場における発展の鍵を握るコンパニオン診断薬の開発状況についての情報を示す。

コンパニオン診断薬の開発状況

適応症	診断薬	開発会社	医薬品 （候補化合物）	開発会社	備考
C 型肝炎ウイルス感染症	PCR 法によるジェノタイプ判定	ロシュ	ペグイントロン	中外製薬 ロシュ	医薬品発売済み
C 型肝炎ウイルス感染症	IL-28B 遺伝子の rs8099917 一塩基多型解析	ラブコープ	ペグインターフェロン α -2b	メルク	医薬品発売済み
B 型肝炎ウイルス感染症	HBs 抗原定量	ロシュ	ペグインターフェロン α -2b	メルク	医薬品発売済み
サイトメガウイルス感染症	PCR 法 サイトメガロウィルス量測定	ロシュ	バルサイト（塩酸バルガンシクロビル）	ロシュ・田辺三菱製薬	医薬品発売済み
乳癌	HER2 たんぱく質発現、HER2 遺伝子増幅	ロシュ	タイケルブ（トシル酸ラパチニブ水和物）	グラクソスミスクライン	医薬品発売済み
ヒト免疫不全ウイルス感染症	PCR 法 HLA-B5701 遺伝子型の測定	ロシュ	硫酸アバカビル	グラクソスミスクライン	医薬品発売済み
BRAF V600 に変異のある切除不能または転移性黒色腫	COBAS 4800 BRAF V600 変異試験（BRAF V600 変異陽性診断）	ロシュ	ゼルボラフ（ベムラフェニブ）	ロシュ・プレシコン（第一三共）	FDA が薬品、コンパニオン診断薬同時承認（2011 年 8 月） 日本：未申請
ALK 陽性の進行性非小細胞肺癌	Vysis ALK Break Apart FISH Probe Kit（ALK 遺伝子変異）	アボット	ザルコリ（クゾチニブ）	ファイザー	FDA が薬品、コンパニオン診断薬同時承認（2011 年 8 月） 日本：医薬品申請（2011 年 3 月）
化学療法走行後の再発または再燃し	CCR 4 の発現有無を検査する診断薬 申請	協和メデックス	KW-0761（モガムリズマブ）	協和発酵キリン	日本：医薬品申請（2011 年

た CCR4 陽性の T 細胞白血病リンパ腫 (ATL)	(2011 年 4 月) 免疫組織化学的手法とフローサイトメトリーを原理とした 2 つの診断薬				4 月
黒色腫のアジュバント治療、非小細胞肺癌	PCR 法ベースの分子診断機器	アボット社の「m2000」と提携	MAGE-A3 抗原特異的癌免疫治療	グラクソスミスクライン	
非小細胞肺癌	KRAS 変異陰性患者を同定	キアゲン社と共同開発を発表 (2011 年 8 月)	(ダコミチニブ)	ファイザー	
非小細胞肺癌	EGFR 変異陰性患者を同定	キアゲン社と共同開発を発表 (2009 年 5 月)	(アファチニブ)	ボーリンジャーインゲルハイム	
多形性膠芽腫	腫瘍中変異 EGFR (EGFRv III) RNA 検出診断キット	キアゲン社と共同開発に合意 (2010 年 2 月)	Rindopepimut (ペプチドワクチン)		
乳癌	抗 HER2/neu (4B5) 抗体または INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail	ロシュ	(トラスツズマブ-DM1)	中外製薬 ロシュ	
乳癌	抗 HER2/neu (4B5) 抗体または INFORM HER2 Dual ISH DNA Probe Cocktail	ロシュ	(パーツズマブ)	中外製薬 ロシュ	
非小細胞肺癌	MUC-1 免疫染色法による患者選択	ロシュ	TG4010 (MVA-MUC1-IL2)	ノバルティス社・トランスジーン社	
気管支喘息	電気化学発光免疫測定法の測定機器「cobas e 301」による血中ベリオスチン濃度レベル測定	ロシュ・ロシュダイアグノスティックス	AF802		
C 型肝炎ウイルス感染症	PCR 法による血中ウイルス量測定	ロシュ	R7128 ポリメラーゼ阻害薬	ロシュ	
C 型肝炎ウイルス感染症	PCR 法による血中ウイルス量測定	ロシュ	ダノプレビル	ロシュ	
全身性エリテマトーデス (SLE)	PCR 法によるインターフェロン誘導性遺伝子の増幅	ロシュ	ロンタリズマブ	ロシュ	
急性骨髄性白血病	FLT-3ITD 検出 PMA キット (遺伝子内縦列重複変異)	アステラス	AC220 FLT-3 阻害剤	アステラス	

進行性膵臓癌	hENT1 expression に対する免疫染色による患者選択	ロシュ	CP-4126	クロビス・オンコロジー社・クロビス・ファーマ社	
ALK 陽性の進行性非小細胞肺癌	FISH, CISH, 免疫染色 (IHC)、リアルタイム PCR 法による診断薬	ロシュ・ロシュダイアグノスティックス	AF802	中外製薬	
非小細胞肺癌、乳癌	Met 遺伝子検査法を開発中	ロシュ・ロシュダイアグノスティックス	RG3638 (MetMAb, 抗 Met 抗体)	中外製薬・ロシュ	
肝細胞癌	免疫染色法による診断薬を開発中	ロシュ・ロシュダイアグノスティックス	Gc-33 (抗グリビカン-3 抗体)	中外製薬・ロシュ	
骨髄増殖性疾患	リアルタイム PCR システム RotorGene Q による JAK2 V617F 変異検出	キアゲン社と提携	LY2784544	イーライリリー	

参考資料：日経バイオテク 2011 年 12 月 19 日号

7. まとめ

バイオチップ業界のガイドラインに関連して、2011 年中における最も重要な動きは、7 月に米国食品医薬品局（FDA）から発表された「コンパニオン診断薬のガイダンス草案」である。本ガイダンスはドラフト段階だが、コンパニオン診断薬と治療薬の同時開発、同時承認申請が強く推奨される内容となっており、今後の体外診断薬市場の方向性を示唆している。本ガイダンスには従来行われてきた CLIA 法の下にある臨床試験所（ラボ）における検査（LDT）は含めないとされているが、FDA が今後 LDT においても監視を強める意向であることが表明されている。

さらに、FDA では、ベネフィット・リスク評価基準のガイダンス草案を発表した。医療機器の市販前承認申請のポイントとして、FDA のベネフィット・リスク評価に対する考え方を明らかにし、適格性審査の透明性を図るとともに、医療機器の正当な効果データおよび安全性データを要求している。患者への最大限のベネフィット還元のために患者が許容できるリスクの限度に対する考え方等の内容になっている。

欧州医薬品庁において発行されたゲノムバイオマーカーに関するガイドライン草案は、臨床試験に関わるものであり、臨床試験のデザイン例を引き、正当な validation 方法、統計解析手法のあり方を示している。核酸試料については、前処理における施設間差など信頼性の不安があることを指摘し、前処理プロセスの標準化の必要性が謳われている。さらに、コンパニオン診断薬にも言及があり、今後、コンパニオン診断薬と治療薬の同時開発を促す伏線と取ることもできるようだ。

いずれも技術実用化に応じたガイドラインが整備しつつあり、個別化医療の実現に向けた動きが活発であることを示す。

日本においては、ゲノムバイオマーカーの ICH（日米 EU 医薬品規制調和国際会議）合意により、ゲノムバイオマーカー適格性確認の手法において、欧米と足並みを揃えている。また、JCCLS（日本臨床検査標準協議会）においては、遺伝子関連検査における検体品質管理マニュアルを発行した。DNA、RNA など分解しやすい核酸の運搬から前処理に至る工程の臨床検査に与える影響のインパクトはいずれの標準化機関等も重要な課題として取り組んでいるところであり、標準化に向けた前進と言える。

今回の委託調査を通じて、国内企業へのアンケート調査、海外企業へのヒアリング調査を合わせて実施したが、核酸の標準物質のニーズや、特に FFPE サンプル（ホルマリン固定パラフィン包埋）からの核酸試料の安定的な定量法については非常にニーズが高いことが分かった。そのような中で、欧州 EU の SPIDIA プロジェクトリーダーに対して、ヒアリング調査を実施することができ、その結果、PAXgene を利用した前処理ツール・プロセスの標準化を強力に進めていることが分かった。その成果として、PFPE（PAXgene 固定パラフィン包埋）という手法として論文発表を行っている。さらに血液サンプルについても近く論文発表をするとのことである。欧州の動きであるが、米国の研究機関とも提携しており、GEN、ISO と既に強力な連携があるものと思っていたが、ヒアリング時には政治的な働きかけはなく、サイエンスのためのアカデミックなプロジェクトグループであるとのことであった。むしろ、米国、日本の様々な機関と連携は歓迎するところである様子であった。

バイオ産業界の動向としては、コンパニオン診断薬、バイオマーカーを取り巻く規制当局の環境整備が進む状況下に、国内外の診断薬メーカー、医療機器メーカー、試薬メーカー等が医療市場への参入を目指している。大手製薬企業においては、自社内でコンパニオン診断薬開発を行う他、国内外の診断薬メーカーとの提携、あるいは企業買収を行い、自社製品のためのコンパニオン診断薬開発に取

り組み始めている。今後のコンパニオン診断薬市場拡大は必至であり、従来の製薬企業、検査会社、医療機器メーカー、試薬メーカーのみならず、様々な業界（食品、化粧品、農業分野等）からも医療分野への参入が増加している。JMAC に参画している企業を中心とするバイオチップ業界でも、独自のバイオマーカーを探索し、診断キット開発・医療機器開発を各社とも目指している。次世代シーケンサーの華やかな登場等により、バイオチップ産業がやや霞んだ感があるが、次世代シーケンサーに比較して、大変安価でカスタマイズの容易なバイオチップは診断用デバイスに応用されてこそ本来の役割を果たすと言える。前処理プロセスの標準化、バイオマーカーの取扱いに関する標準化とともにコンパニオン診断薬市場の拡大が期待され、遺伝子発現解析用 DNA チップの役割も増大するものと思われる。

以上

この報告書は、平成２３年度に独立行政法人 産業技術総合研究所が、経済産業省からの委託を受けて実施した成果を取りまとめたものです。

— 禁無断転載 —

平成２３年度 戦略的技術開発委託費
医療機器等の開発・実用化促進のためのガイドライン策定事業
(医療機器に関する開発ガイドライン作成のための支援事業)
テラーメイド医療用診断機器分野 (DNAチップ)
開発ワーキンググループ報告書

連絡先

〒100-8901
東京都千代田区霞が関 1-3-1
経済産業省商務情報政策局 ヘルスケア産業課
医療・福祉機器産業室
TEL : 03-3501-1562
FAX : 03-3501-0315
URL : <http://www.meti.go.jp/>

発行

〒305-8564
茨城県つくば市東 1-1-1
独立行政法人 産業技術総合研究所ヒューマンライフテクノロジー研究部門
医療機器開発ガイドライン検討実務委員会
TEL/FAX : 029-861-7840
E-Mail : human-ws@m.aist.go.jp